



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

MODULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE
GENES DE LA VÍA DE NF- κ B Y
CITOQUINAS EN RESPUESTA AL
TRATAMIENTO CON
METILTIOADENOSINA EN CÉLULAS
DE PACIENTES CON PET INFECTADOS
POR HTLV-1

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ANDRÉS ESTEBAN POSADAS YÁBAR

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR:

Michael Talledo Albújar, Ph.D.

JURADO:

PRESIDENTE

Dr. Jorge Arévalo Zelada.

SECRETARIO

Dr. Daniel Clark Leza.

VOCAL

Dra. Patricia Herrera Velit.

DEDICATORIA

A mis padres, Sara y David, por su apoyo e impulso brindado para culminar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvan para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

Quiero agradecer de manera especial a mi asesor, el Dr. Michael Talledo, por la dedicación de su tiempo en la orientación, supervisión, y apoyo en la mejora del presente trabajo de investigación.

Quiero hacer extensiva mi gratitud a todos los miembros de la Unidad de Virología/HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAvH). Por su contribución a mi formación científica y por la confianza en mí depositada.

Finalmente, quiero expresar mi enorme gratitud con los pacientes de la cohorte de HTLV del IMTAvH, que aceptaron participar del estudio y brindar sus muestras sanguíneas con el fin de que podamos aportar conocimientos para poder combatir y comprender mejor a la paraparesia espástica tropical asociada a HTLV-1.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación y los estudios de postgrado del investigador fueron financiados a través de una beca integral otorgada por los proyectos:

“Modulación de la vía de NFκB en células de pacientes infectados por HTLV-1 como blanco para el tratamiento de paraparesia espástica tropical” - FONDECYT. Número de proyecto: 119-2016.



“Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”- FOGARTY. Grant number: 2D43TW007120-11^o1.



Índice

I. Introducción	1
II. Planteamiento de la Investigación	7
2.1 Planteamiento del Problema.....	7
2.2 Marco teórico	8
2.2.1 Virus humano linfotrópico de células T tipo 1	8
2.2.2 Epidemiología	9
2.2.3 Transmisión.....	12
2.2.4 Células hospederas e integración viral.....	13
2.2.5 Proteínas virales.....	15
2.2.6 Diagnóstico de la infección por HTLV-1.....	18
2.2.7 Paraparesia espástica tropical	19
2.2.8 Vía de NF- κ B.....	21
2.2.9 Metiltioadenosina	23
2.3 Justificación del estudio	25
2.4 Hipótesis.....	26
2.5 Objetivo	27
2.5.1 Objetivo general.....	27
2.5.2 Objetivos específicos.....	27
III. Metodología	28
3.1 Diseño del estudio	28
3.2 Población.....	30
3.3 Muestra	31
3.4 Procedimientos y técnicas.....	32
3.4.1 Procedimientos generales:	32
3.4.1.1 Aislamiento de PBMC	32
3.4.1.2 Efecto dosis respuesta de MTA	33
3.4.1.3 Cultivo celular.....	34
3.4.1.4 Extracción de la fracción nuclear y citoplasmática.....	34
3.4.1.5 Cuantificación de la actividad de la vía de NF- κ B.....	35
3.4.2 Procedimientos exclusivos Fase I:.....	36
3.4.2.1 Extracción de ARN	36
3.4.2.2 Ensayo de control de calidad del ARN	37
3.4.2.3 Ensayo de expresión de genes de la vía de NF- κ B.....	37

3.4.2.4 Contribución del ADN genómico	38
3.4.2.5 Cuantificación de citoquinas pro y antiinflamatorias.....	39
3.4.3 Procedimiento exclusivo Fase II:.....	39
3.4.3.1 Detección de INF- γ intracelular.....	39
3.5 Bioseguridad.....	40
3.6 Consideraciones éticas.....	40
3.7 Plan de análisis	41
IV. Resultados	42
4.1 Resultados correspondientes a la Fase I	42
4.1.1 Determinación de la concentración de MTA	42
4.1.2 10 μ M de MTA reduce la activación de la vía de NF- κ B	43
4.1.3 Calidad de ARNm	44
4.1.4 Los PBMC de los pacientes con PET incubados con MTA no muestran disminución en la expresión de genes regulados por la vía de NF- κ B	45
4.1.5 Contribución del ADN genómico.....	46
4.1.6 MTA no disminuye la respuesta Th1 y Th2.....	47
4.2 Resultados correspondientes a la Fase II	48
4.2.1 Determinación de la concentración de MTA	48
4.2.2 Comprobación de la actividad antiinflamatoria de MTA.....	51
4.2.3 MTA disminuye el porcentaje de células productoras de IFN- γ en PBMC de pacientes con PET	54
4.2.4 500 μ M de MTA no disminuye significativamente la actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET	55
V. Discusión	59
5.1 Fase I: Evaluación del efecto de MTA	62
5.1.1 Determinación de la concentración de MTA	62
5.1.2 Impacto de 10 μ M MTA sobre la actividad de la vía NF- κ B en pacientes con PET.....	63
5.1.3 Variabilidad en la actividad de la vía de NF- κ B	64
5.1.4 Efecto del tratamiento con 10 μ M de MTA sobre la expresión de genes y citoquinas	67
5.1.5 Conclusiones Fase I	69
5.2 Fase II: Reevaluación de la concentración de MTA y su efecto sobre células inducidas a inflamación y PBMC de pacientes con PET	69
5.2.1 Determinación de la concentración efectiva de MTA.....	69
5.2.2 Actividad antiinflamatoria de MTA y tiempo de tratamiento	70

5.2.3 Efecto antiinflamatorio de MTA sobre células de pacientes con PET	71
5.2.4 Impacto antiinflamatorio de 500 μ M de MTA sobre la vía de NF- κ B en células de pacientes con PET	73
5.2.5 Conclusiones Fase II	75
VI. Conclusiones	75
VII. Limitaciones y Recomendaciones.....	76
VIII. Referencias bibliográficas.....	77
Anexos	93

Índice de Figuras

Figura 1. Vía canónica y no canónica de NF- κ B	4
Figura 2. HTLV-1	9
Figura 3. Distribución de HTLV-1 en el mundo	10
Figura 4. Distribución de subtipos de HTLV-1.....	11
Figura 5. Actividad de Tax	17
Figura 6. Interacción de la vía de NF- κ B y Tax	18
Figura 7. Posible patogénesis de PET	21
Figura 8. Formación de metiltioadenosina.....	25
Figura 9. Flujograma del estudio	29
Figura 10. Efecto de MTA sobre PBMC de individuos sanos	43
Figura 11. Actividad de la vía de NF- κ B	44
Figura 12. Expresión de genes regulados por la vía de NF- κ B	46
Figura 13. Cuantificación de los niveles de citoquinas proinflamatorias.....	48
Figura 14. Parámetros celulares postratamiento con MTA 3 horas	50
Figura 15. Parámetros celulares postratamiento con MTA 6 horas	50
Figura 16. Parámetros celulares postratamiento con MTA 24 horas	51
Figura 17. Concentración letal media de MTA sobre PBMC de individuos sanos	51
Figura 18. IFN- γ intracelular en PBMC de individuos sanos	53
Figura 19. IFN- γ intracelular postratamiento con MTA en individuos sanos	53
Figura 20. IFN- γ intracelular en PBMC de pacientes con PET	54
Figura 21. IFN- γ intracelular postratamiento con MTA en pacientes con PET	55
Figura 22. Actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET	56
Figura 23. Picos de melting para el gen B2M pool 2 muestras	95
Figura 24. Picos de melting para el gen B2M pool 4 muestras	95
Figura 25. Picos de melting para el gen GAPDH pool 2 muestras	96
Figura 26. Picos de melting para el gen GAPDH pool 2 muestras	96

Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de inhibición de la vía de NF- κ B	6
Tabla 2. Criterios de Inclusión y Exclusión de pacientes con PET	30
Tabla 3. Criterios de Inclusión y Exclusión de individuos sanos	31
Tabla 4. Resumen de los resultados de la Fase I y II	57
Tabla 5. Lista de genes evaluados en el superarray	93
Tabla 6. Ensayo RT-PCR para 2 genes de referencia	97

Índice de Anexos

Anexo 1. Lista de genes evaluados en el superarray	93
Anexo 2. Gráficas de picos de <i>melting</i>	95
Anexo 3. Ensayo RT-PCR para 2 genes de referencia	97

Abreviaturas

ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	:	Ácido desoxirribonucleico codante
ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
ATL	:	Leucemia de células T del adulto
B2M	:	Beta 2 microglobulina
BSA	:	Albumina de suero bovino
CBS	:	Estándar de bioseguridad canadiense
CDC	:	Centro de control y prevención de enfermedades
CNRQ	:	Cuantificación relativa normalizada calibrada
CPV	:	Carga proviral
Ct	:	Ciclo límite
ELISA	:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
GAPDH	:	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GDC	:	Control de contaminación de ADN genómico
GLUT-1	:	Receptor de transporte de glucosa 1
GM-CSF	:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HBZ	:	Factor bZIP
HGE	:	Genes constitutivos
HLA I	:	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1
HK1	:	Gen de alta expresión (ACTB)
HK2	:	Gen de baja expresión (HPRT1)
HSPG	:	Proteoglicanos heparán-sulfato
HTLV-1	:	Virus linfotrópico de células T del humano tipo 1
HTLV-2	:	Virus linfotrópico de células T del humano tipo 2
ICAM1	:	Molécula de adhesión intracelular 1
IFN- α	:	Interferón alfa
IFN- γ	:	Interferón gamma
I κ Bs	:	Familia de proteínas inhibidoras de la vía de NF- κ B
I κ B α	:	Inhibidor de la vía NF- κ B alfa

IKK	:	Quinasa de I κ B
IL-1 β	:	Interleucina 1 beta
IL-4	:	Interleucina 4
IL-5	:	Interleucina 5
IL-6	:	Interleucina 6
IL-8	:	Interleucina 8
IL-9	:	Interleucina 9
IL-10	:	Interleucina 10
IL-12p70	:	Interleucina 12
IL-17A	:	Interleucina 17
IL-18	:	Interleucina 18
IL-21	:	Interleucina 21
IL-22	:	Interleucina 22
IL-23	:	Interleucina 23
IL-27	:	Interleucina 27
IMTA _{vH}	:	Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt
MTA	:	Metiltioadenosina
NF- κ B	:	Factor nuclear kappa b
NFKBIA	:	Gen del Inhibidor alfa del factor nuclear kappa b
NRP-1	:	Receptor proteico neuropilin-1
NRQ	:	Cuantificación relativa normalizada
NRT	:	Control sin transcriptasa reversa
NTC	:	Control sin ARN ni ADNc
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
PA	:	Portador asintomático
PBMC	:	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	:	Solución tampón de fosfato salino
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDTC	:	Pirrolidina ditiocarbamato
PET	:	Paraparesia espástica tropical
PPC	:	Control positivo
qPCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RQ	:	Cuantificación relativa
RT-PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDS-PAGE	:	Electroforesis de gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato
SNP	:	Polimorfismos de un solo nucleótido
TLR	:	Receptores de tipo toll
TNF- α	:	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	:	Factor de necrosis tumoral beta
VEGFA	:	Factor de crecimiento endotelial vascular-A
VIH	:	Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

Entre 5 y 10 millones de personas están infectadas con el virus linfotrópico de células T del humano tipo 1 (HTLV-1) en el mundo. En el Perú alrededor de 150 000 a 450 000 personas estarían infectadas con este retrovirus, de las cuales aproximadamente el 10% desarrolla algún tipo de complicación durante sus vidas como la mielopatía/paraparesia espástica tropical (PET).

Está es una enfermedad inflamatoria que afecta a la médula espinal y no existe un tratamiento actual estandarizado contra esta enfermedad, solo tratamiento para aliviar los síntomas presentes.

Se hipotetiza que la patogénesis de PET está asociada a la actividad de la vía de NF- κ B, la cual está sobre activada en estos pacientes. En un estudio previo de nuestro grupo, se identificó SNP ubicados en el promotor del gen *NFKBIA*, inhibidor de la translocación de NF- κ B al núcleo, que están asociados con la presencia de PET. Además, este gen muestra una menor expresión en pacientes con PET en comparación con individuos asintomáticos.

La metiltioadenosina (MTA) es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria producida por la activación de la vía de NF- κ B. Con base en esto, este estudio evaluó el efecto *in vitro* de MTA sobre células de pacientes con PET con el propósito de modular la actividad de la vía NF- κ B y disminuir la respuesta inflamatoria.

Para ello, se aisló células de sangre periférica de pacientes con PET, las cuales, se trataron con 10 y 500 μ M de MTA por 6 y 24 horas. Postratamiento se midió la actividad de la vía de NF- κ B e IFN- γ intracelular. Se observó que existe

una respuesta heterogénea en la actividad de la vía de NF- κ B tanto en ausencia y presencia de ambas concentraciones de MTA. El tratamiento 10 μ M de MTA disminuyó significativamente la actividad de la vía de NF- κ B. Sin embargo, no se evidenció una variación en los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias y citoquinas secretadas. Mientras, 500 μ M de MTA disminuyó significativamente el porcentaje de células CD 45+ productoras de IFN- γ (*p-value* = 0.02), donde por citometría se excluyó a la subpoblación de monocitos. Este hallazgo sugiere que MTA disminuye la respuesta inflamatoria de pacientes con PET a nivel de células CD45+ IFN- γ , los cuales, podrían ser linfocitos T CD8.

Palabras clave

Antiinflamatorio, MTA, NF κ B, HAM/TSP

Abstract

Approximately between 5 to 10 million of people are infected with Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) worldwide. In Peru around 150 – 450 thousand people are infected with HTLV-1 form which only 10% develop an associated disease such as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or HAM/TSP. HAM/TSP is a neuroinflammatory disease which affects the spinal cord. There is no available cure for HAM/TSP, only symptomatic treatment.

The possible pathogenesis of PET may be associated with the overactivation of NF- κ B pathway. Previous research from the Virology unit, found that NFKBIA gene, inhibitor of NF- κ B transcription factor, is associated with HAM/TSP. These patients present lower expression of this gene compared with asymptomatic carriers.

Methylthioadenosine or MTA, is an intermediate metabolite in the salvage pathway of Adenine capable of reduce the inflammatory response produce by the NF- κ B pathway. This project aims to evaluate the effect of MTA *in vitro* in PBMCs from HAM/TSP patients to reduce their inflammatory response. Hence, PBMCs from HAM/TSP patients were isolated and treated with 10 and 500 μ M of MTA for 6 and 24 hours. Cells were harvested and NF- κ B activity was measured, as well as, gene expression of regulated genes by NF- κ B, proinflammatory cytokines and intracellular IFN- γ .

The NF- κ B activity was variable among HAM/TSP patients regardless of the treatment, but after treatment with 10 μ M of MTA the NF- κ B activity was

significantly reduced. However, neither the genes regulated by the NF- κ B pathway, nor those encoding proinflammatory cytokines showed a decrease in their expression levels. Furthermore, 500 μ M of MTA not only decreased the Th1 response in PMA stimulated PBMCs (*p-value* < 0.05) but also reduced significantly the percentage of IFN- γ CD45+ cells in HAM/TSP patients (*p-value* = 0.02). These results suggest that MTA display an inflammatory response modulation by reducing the CD45+ IFN- γ cells response in HAMTSP patients.

Key words

Anti-inflammatory, MTA, NF κ B, HAM/TSP

I. Introducción

La infección por el Virus linfotrópico de células T del humano tipo 1 (HTLV-1) afecta alrededor de 5-10 millones personas en el mundo (1). El número de personas infectadas podría ser mayor debido a que los datos se tomaron de donadores de sangre, mujeres embarazadas y algunos estudios de prevalencia, pero no de población en general.

Latinoamérica es considerada como una región de alta incidencia, donde países como Brasil, Colombia y Perú son considerados endémicos para HTLV-1. En el Perú se estima que algo más del 1% (450 000) de la población se encuentra infectada por HTLV-1 (1), siendo ésta aproximadamente el triple de las infecciones por VIH (2).

El HTLV-1 se trasmite a través de las mismas rutas que el VIH, las cuales son: la lactancia materna, relaciones sexuales, jeringas con fluidos contaminados y transfusiones sanguíneas (3). Posterior a la transmisión del virus, este infecta preferentemente linfocitos T CD4+; sin embargo, también puede infectar linfocitos T CD8+ (4) y células dendríticas (5).

Enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1

Aproximadamente el 10% de infectados por HTLV-1 desarrolla alguna complicación asociada (3). Existen principalmente 2 enfermedades asociadas a HTLV-1: la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL) y la paraparesia espástica tropical (PET) o HAM/TSP (HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis), por sus siglas en inglés (6). Ambas enfermedades son incurables en la actualidad.

Existen otras enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1 como son: uveítis (7), dermatitis infecciosa (8) y la infección por organismos oportunistas, tales como *Strongyloides stercoralis*, *Sarcoptes scabiei* y *Mycobacterium tuberculosis* (3).

En el Perú no existe un reporte nacional sobre el número de personas que presentan ATL o PET. Sin embargo, desde 1991 el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt ha seguido una cohorte de personas infectadas con HTLV-1 (9) en la que se ha observado una mayor frecuencia de casos de personas asintomáticas y con paraparesia espástica tropical en comparación con casos de ATL.

ATL es una leucemia de linfocitos T CD4 que puede ser clasificada en 4 subtipos dependiendo del conteo linfocitario y gravedad de los síntomas: latente, crónica, aguda y linfomatosa (4). Los estudios sugieren que ATL estaría relacionado a la transmisión por lactancia materna. Uno de los principales tratamientos es la quimioterapia; sin embargo, la prognosis de los pacientes con ATL agudo es aproximadamente seis meses de vida (3).

Se presume que las proteínas virales Tax y HBZ están involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Inicialmente Tax lleva a la célula a un estado de proliferación anormal, en el cual, los mecanismos de reparación del daño al ADN están en su mínima expresión y, por consiguiente, estos daños se van acumulando. Posteriormente, como mecanismo de escape del sistema inmunitario, HBZ reemplaza las funciones de Tax, manteniendo las mutaciones o daños presentes en el ADN de las células (3,10).

PET, por otro lado, es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de la parte baja de la médula espinal (5), la cual, se manifiesta con una espasticidad en los miembros inferiores que dificulta el caminar, acompañado de dolor de espalda y problemas urinarios (3). Por lo general, a mayor edad la prevalencia de PET aumenta en 5 veces, mientras que para las mujeres, hasta en 9 veces (11). El mayor riesgo de que las mujeres presenten PET con mayor frecuencia que los hombres ha sido reportado de manera consistente en diversos países (12–14).

Se presume que la patogénesis de PET se debe a una mayor infiltración de linfocitos a la materia blanca de la medula espinal respecto a la materia gris y a la exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias. Ambos procesos estarían generando un daño a nivel de los axones de las neuronas (5) y, por lo tanto, se presentarían los síntomas mencionados.

La producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias estaría relacionada a la sobre activación de la vía NF- κ B a causa de la proteína Tax de HTLV-1 (15). La activación de esta vía, además de promover la expresión de citoquinas proinflamatorias, está relacionada a otros procesos celulares como la supervivencia celular, la organogénesis linfoide, la supervivencia y maduración de linfocitos B (16).

La vía de NF- κ B

La vía NF- κ B es una vía de respuesta rápida de regulación celular, dado que las proteínas que conforman el factor de transcripción (RelA, c-Rel, RelB, p105/p50 y p100/p52) se encuentran secuestradas en el citoplasma por la familia de proteínas I κ Bs. Por lo tanto, no es necesaria la síntesis de *nov*o de proteínas para la activación

de la vía (15,17). Dependiendo de la vía, ya sea canónica o no canónica, habrá un proceso de activación diferente (Figura 1).

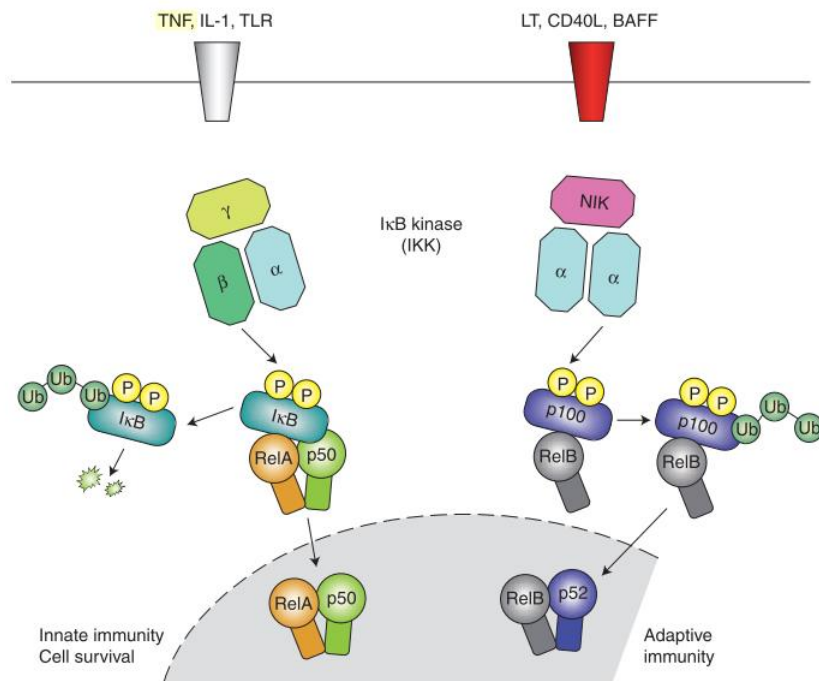


Figura 1. Vía canónica y no canónica de NF-κB. La activación de la vía canónica esta mediada por TNF e IL-1, conlleva a que el complejo IKK fosforile a la proteína IκB, la cual irá a degradación en el proteosoma, libere al factor de transcripción y éste pueda entrar al núcleo para promover la supervivencia celular y la producción de citoquinas inflamatorias. La activación de la vía no canónica se da por LT, CD40L y BAFF, y conlleva al complejo IKK a fosforilación de p100, lo cual, libera al factor de transcripción y puede trasladarse al núcleo y promover la supervivencia de linfocitos B.
Fuente: Lawrence. 2009. (18)

En el caso de la vía canónica, el complejo IKK fosforila a IκB, generando su ubiquitinación y degradación en el proteosoma y ocasionando la liberación del complejo RelA/p50. Este es capaz de ingresar al núcleo e inducir la expresión de genes relacionados a la proliferación y diferenciación de linfocitos T, así como de genes de citoquinas proinflamatorias, quimoquinas, entre otros. Por otro lado, en el caso de la vía no canónica, la quinasa NIK activa al complejo IKKα el cual fosforila

el residuo C-terminal de RelB/p100, promoviendo su ubiquitinación y la formación del complejo RelB/p52, el cual también es capaz de ingresar al núcleo (16).

Una vez que NF- κ B se transloca al núcleo, no solo promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias, sino también, de su propio inhibidor I κ B α (19). Esto actúa como un control de retroalimentación negativa de la vía, asegurando que la activación sea limitada y transitoria (19). En pacientes con PET se ha encontrado que SNPs ubicados en el promotor del gen NFKBIA (codifica a la proteína I κ B α) están asociados a la presencia de PET (20); asimismo, en pacientes con PET se ha encontrado una disminución de los niveles de ARNm del gen NFKBIA en comparación con individuos asintomáticos (21), lo que posiblemente haría que se genere una menor cantidad de proteína I κ B α y por lo tanto una mayor activación de la vía de NF- κ B. Estos antecedentes sugieren que la proteína I κ B α tendría un rol importante en la mayor activación de NF- κ B y la presencia de la enfermedad en individuos infectados por HTLV-1.

Existen diversas formas de inhibir o modular la vía de NF- κ B (Tabla 1) mediante el uso de compuestos antagonistas de los receptores o inhibidores de la cascada de señalización; sin embargo, estos bloqueadores de la activación de la vía de NF- κ B podrían no solo disminuir su activación, sino también la de otras vías de señalización que están relacionadas con los receptores. Una aproximación alternativa es el empleo de moléculas o drogas capaces de aumentar los niveles de ARNm de I κ B α o aumentar la vida media del inhibidor para modular de manera más específica la actividad de la vía NF- κ B, y, por consiguiente, reducir los efectos inflamatorios. Esta aproximación podría sentar las bases de un posible tratamiento

de PET, dado que actualmente no se cuenta con un tratamiento estandarizado y solo se tratan los síntomas en los pacientes afectados por esta enfermedad.

Tabla 1. Tipos de inhibición de la vía NFκB. Fuente: Karin M. 2011 (22)

Tipo de inhibidor	Compuestos
Receptores	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos Anti-TNF • Herceptina
Adaptador	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de ubiquitinasas
IKK inhibidores	<ul style="list-style-type: none"> • Compuestos tiol-reactivos • Análogos de ATP • Inhibidores alostéricos • Péptidos de unión a NEMO
Estabilizadores de IκB	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de proteosoma • Fosfopéptidos de IκB • Inhibidores de la fosforilación
Retención citoplasmática	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos NLS p50 • DHMEQ
Factor de transcripción inhibidores	<ul style="list-style-type: none"> • Oligonucleótidos truncados • Compuestos tiol-reactivos

Un posible candidato es la metiltioadenosina (MTA), un compuesto que ha mostrado un potente efecto sobre la modulación de la respuesta inflamatoria (23,24). En células tumorales se ha observado una acumulación de MTA, mediada por la deficiencia en la enzima que la degrada y que es liberada al microambiente celular, lo que genera una inhibición en la activación y en la proliferación de linfocitos T. Este hallazgo estaría evidenciando un efecto inhibitor sobre estas células (24). A su vez, se ha evaluado como posible fármaco en la esclerosis múltiple (ME), donde se observó una disminución de la inflamación en células de pacientes con ME y del daño cerebral en ratones, y un aumento en el nivel de la proteína IκBα (25).

Actualmente, no existen estudios donde se haya evaluado el efecto de MTA sobre la vía de NF- κ B en pacientes infectados con HTLV-1. Por ello, la presente investigación exploratoria propone evaluar el efecto modulador *in vitro* de MTA sobre la vía de NF- κ B en células de pacientes con PET.

II. Planteamiento de la Investigación

2.1 Planteamiento del Problema

Desde el punto de vista de las enfermedades asociadas a HTLV-1, ATL ha sido una de las enfermedades más estudiadas y en ciertas regiones, como en el Japón, está dentro de las políticas de salud pública. Es de interés de la investigación por su carácter neoplásico. En este contexto la paraparesia espástica tropical ha quedado, en cierta medida, relegada en ambos aspectos. Sin embargo, la paraparesia espástica tropical es una de las enfermedades que más se presenta entre los pacientes infectados por HTLV-1 en nuestro país.

No se conoce en su totalidad el mecanismo o las condiciones por los cuales un individuo infectado desarrolla PET. Se cree que posiblemente se deba a la infiltración de linfocitos y macrófagos a la medula espinal y a la sobreactivación de la vía NF- κ B. Actualmente no existe un tratamiento estandarizado, y los disponibles solo están enfocados en disminuir o aminorar los síntomas generados, mas no en detener la progresión de la enfermedad. Es posible que el conocimiento de los mecanismos de patogénesis de PET y la búsqueda de moléculas que modulen estos mecanismos podrían ser de utilidad para el tratamiento de esta enfermedad.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Virus humano linfotrópico de células T tipo 1

HTLV-1 pertenece al grupo de los retrovirus y está dentro del género Deltaretrovirus. Posee un genoma del tipo ARN, presentando 2 copias de 9kb aproximadamente. Su conformación estructural presenta proteínas de superficie, una bicapa lipídica y nucleocápside (Figura 2A).

Su genoma codifica las proteínas comunes entre los retrovirus (proteasa, integrasa y transcriptasa reversa), además, proteínas accesorias como Rex, Tax, y HBZ (Figura 2B). La proteína Rex, participa como regulador postraducciona de la expresión viral. Las proteínas Tax y HBZ, promueven la proliferación celular, pero la expresión de HBZ es tardía y posee otras funciones opuestas a Tax. Estas proteínas tienen un rol imprescindible durante la infección viral a la célula blanco y su supervivencia en el organismo.

Una vez que el virus infecta a la célula, su genoma de ARN se convierte a ADN por la enzima transcriptasa reversa, y se inserta en el ADN genómico de la célula.

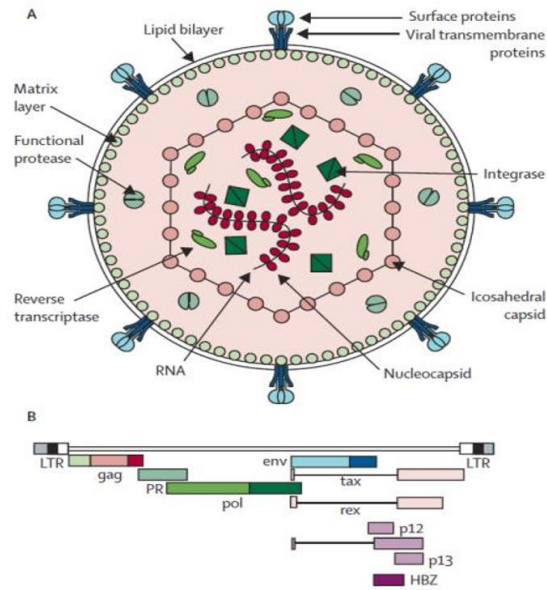


Figura 2 HTLV-1 A) Conformación estructural de HTLV-1. B) Genoma viral de HTLV-1. Fuente: Verdonck, et al. 2007. (3)

2.2.2 Epidemiología

En 2012 se realizó una estimación del número de personas a nivel mundial infectadas con HTLV-1, la cual, determinó que hay entre 5 a 10 millones de personas con el virus. No obstante, como declaran los autores este número podría ser mayor, dado que, el estudio solo analizó los datos de bancos de sangre y estudios de prevalencia. (1).

La distribución de la infección por HTLV-1 es global; sin embargo, esta se encuentra dispersa en diversos focos de infección (Figura 3) (1,6). En Asia, Japón es el país con más casos en la región (1 300 000); en África, Nigeria presenta un estimado de 1 700 000 de personas infectadas con el virus; y en América, Brasil y Perú son los países con mayor número de personas infectadas en la región con aproximadamente 800 000 y 450 000, respectivamente (1).

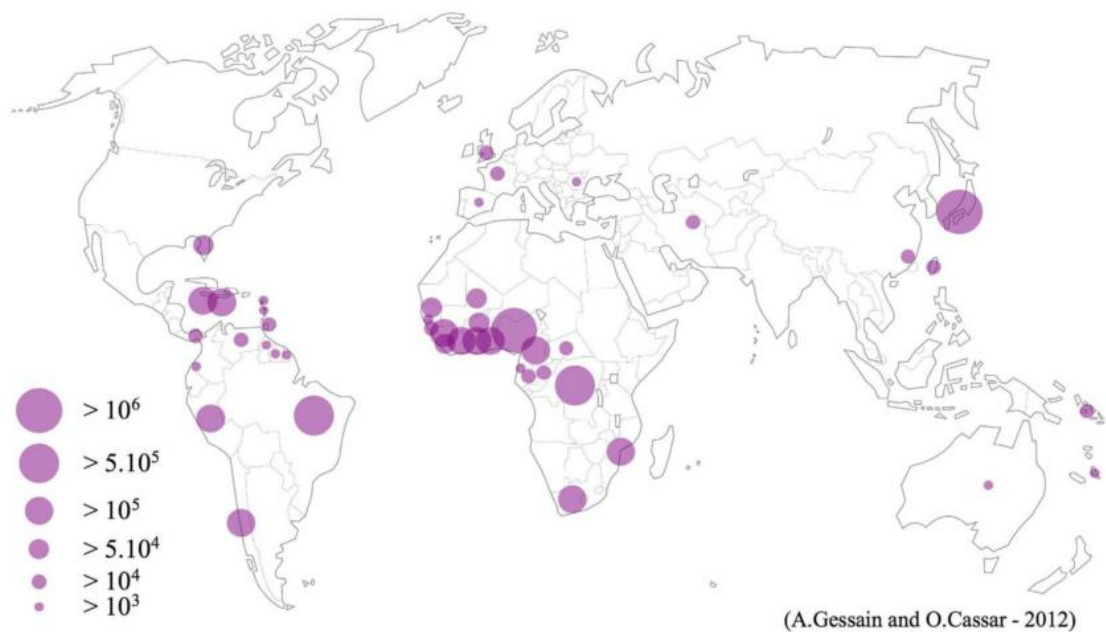


Figura 3. Distribución de HTLV-1 en el mundo. Fuente: Gessain & Cassar, 2012. (1)

La prevalencia puede aumentar drásticamente en zonas de alta endemidad; por ejemplo, se ha reportado en un pueblo de Japón que la prevalencia llegaría hasta el 40% de personas infectadas mayores de 50 años (1). En el Perú, se ha reportado que la población Aymara y Quechua hablante al sur de la cordillera de los Andes presenta una alta prevalencia (1.6 a 4.5%) (26,27).

A su vez, se ha observado que la seroprevalencia de la infección por HTLV-1 estaría relacionada al sexo de la persona. Diversas investigaciones en varios países han mostrado que en mujeres hay un mayor riesgo de adquirir la infección por el virus, aproximadamente 3 veces más, en comparación con hombres (1,3,28–30).

Otro aspecto importante es que la mayoría de personas infectadas permanece asintomática toda su vida (3). Esto ocasiona una expansión silenciosa de la infección por HTLV-1. Aproximadamente el 10% de las

personas infectadas por HTLV-1 desarrolla alguna complicación asociada, donde, las enfermedades más prevalentes o frecuentes y más importantes son: ATL, aproximadamente 1-5%; y PET, 0.3-4% (3).

Finalmente, existen varias cepas de HTLV-1 circulando alrededor del mundo, pero presentan pocas variaciones de nucleótidos entre ellas. Estas variaciones permiten agrupar las cepas en 7 subtipos. No obstante, son 4 los principales de acuerdo a su distribución geográfica: Subtipo A, Cosmopolita; Subtipo B, África central; Subtipo C, Australia-Malasia; y Subtipo D, Pigmeos. (Figura 4) (1,3). Adicionalmente, las pocas diferencias entre sus secuencias no explican el desarrollo de las enfermedades asociadas. En otras palabras, estas variaciones no explican por qué un individuo asintomático desarrolla ATL o PET (10).

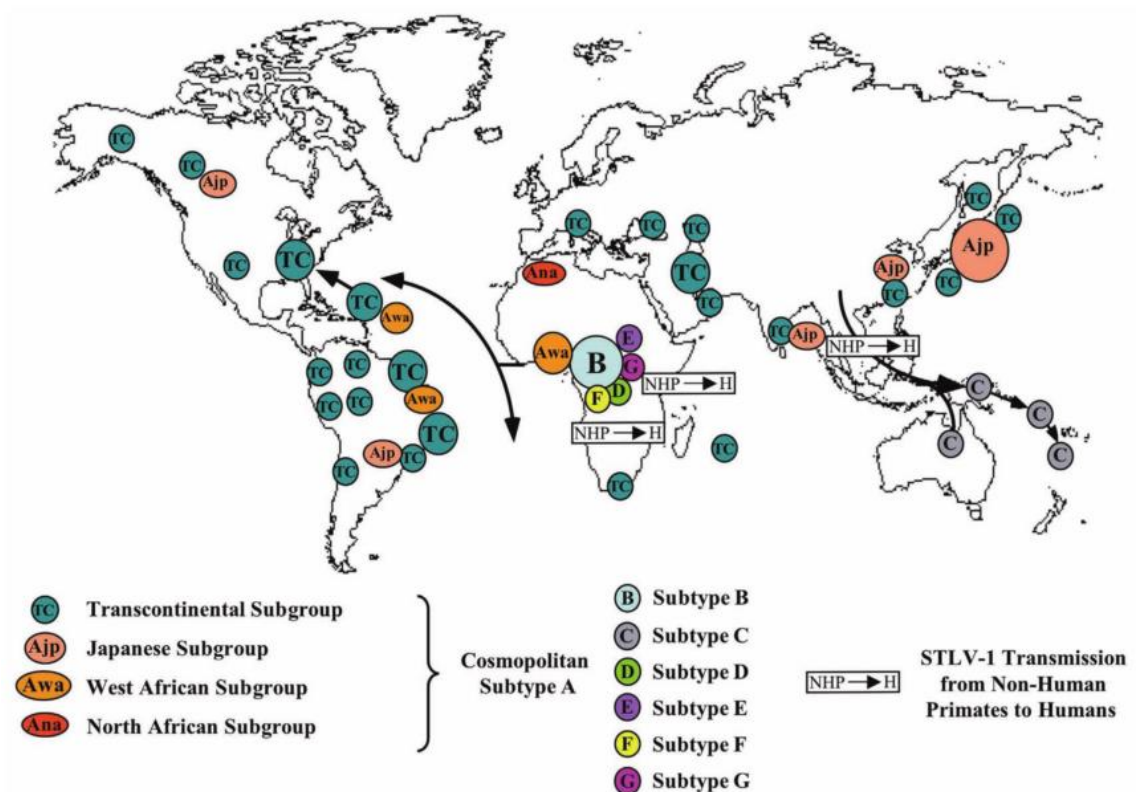


Figura 4. Distribución de subtipos de HTLV-1. Fuente: Gessain & Cassar, 2012 (1)

2.2.3 Transmisión

Existen varias formas de contraer la infección por HTLV-1: a través de la lactancia materna, a través de transmisión sexual, el uso de jeringas expuestas a fluidos contaminados con HTLV-1 y a través de transfusiones sanguíneas (6).

La transmisión por lactancia materna está relacionada a la presencia de linfocitos T en la leche materna. La concordancia del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 (HLA I) entre el niño y la madre es un factor de riesgo para la infección del recién nacido. Otros factores de riesgo son la correlación entre la carga proviral en sangre y en la leche materna, así como la duración de la lactancia materna (3).

En recién nacidos alimentados por lactancia materna se ha observado una mayor frecuencia de transmisión de HTLV-1, entre 15-25%. Conforme la lactancia materna sea prolongada la tasa de transmisión se incrementa a más del 25% (3). Por otro lado, recién nacidos que no fueron alimentados vía lactancia materna presentan un 5.7% de riesgo de adquirir la infección por HTLV-1. En los países donde existe alta prevalencia de HTLV-1 como el Perú, se presume que la lactancia materna es la forma más frecuente de transmisión de la infección (31).

La transmisión de HTLV-1 a través de las relaciones sexuales sucede porque HTLV-1 está presente en las secreciones genitales de personas infectadas (3). La transmisión de HTLV-1 es mayor de hombres a

mujeres, que de mujeres a hombres, 60.8% a comparación de un 0.4% (31). El uso de preservativos puede prevenir la infección por HTLV-1 (3).

Respecto a la transmisión sanguínea se ha reportado que el uso de jeringas expuestas a fluidos contaminados con HTLV-1 es una forma de transmisión entre drogadictos (3). Mediante esta vía de transmisión, en ciertas regiones de América del Norte y Europa es más frecuente la infección por HTLV-2; por el contrario, en regiones como Brasil donde hay mayor frecuencia de infección por HTLV-1 en drogadictos (3,31).

Las transfusiones de sangre contaminada con HTLV-1 presentan otra forma de transmisión de la infección. Esta vía es la ruta más eficiente de transmisión; en Jamaica se reportó una seroconversión del 44% y en Japón hasta 63% (31). Cabe mencionar que en todas las formas de transmisión de HTLV-1 se requiere la presencia de células infectadas por HTLV-1.

2.2.4 Células hospederas e integración viral

Una vez que el HTLV-1 ingresa al hospedero, el virus infecta, aproximadamente en el 95% de los casos, a las células T CD4+ pero también infecta a células T CD8+, neutrófilos, monocitos y células dendríticas, *in vivo*. Sin embargo, también es capaz de infectar microglías y astrocitos *in vitro* (32,33). Un posible mecanismo de ingreso de HTLV-1 en un linfocito T CD4+ no infectado es mediante la interacción con el receptor de transporte de glucosa 1 (GLUT-1) (34), proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG) (35) y el receptor proteico neuropilin-1 (NRP-1) (36).

Se ha observado que los niveles de GLUT-1 *in vitro* aumentan cuando sucede la activación de los linfocitos. Esto conlleva a un incremento en la obtención de nutrientes como aminoácidos y glucosa, para suplir la demanda energética y biosintética (37,38). GLUT-1 tiene como función el transporte de glucosa del espacio extracelular al intracelular.

Los HSPG tienen como función establecer un gradiente de concentración por medio del secuestro de citoquinas u otros mediadores solubles (35). Sirven como sitio de unión para varios virus, tales como herpes virus, adenovirus, papiloma virus y ciertos retrovirus (39). Adicionalmente, linfocitos T CD4+ con HSPG bloqueado reducen la infección por HTLV-1 en otras células (39).

NRP-1 actúa como receptor de la semaforina y del factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGFA) (36), y participa en la regulación de la angiogénesis así como en la regulación de las señales que rigen la orientación axonal. Se encuentra expresado en linfocitos T y células dendríticas (40). Existe una interacción entre la glicoproteína de superficie de HTLV-1 de la célula infectada y NRP-1 de la célula no infectada y la célula infectada, lo que sugiere que NRP-1 actúa en la estabilidad y formación de la sinapsis virológica (36).

Luego que HTLV-1 infectó la célula, una enzima, la transcriptasa reversa, se encarga de convertir el ARN viral en ADN. El ADN viral se integra al ADN genómico y la célula infectada expresa las proteínas virales.

Se propone que una vez que HTLV-1 ingresa a la célula ya no se encuentran partículas virales en el espacio extracelular (9).

La transmisión de HTLV-1 de célula a célula está mediada por moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) (41) generando la sinapsis virológica. Cada vez que el provirus se integra al ADN genómico se presume que lo hace en un sitio diferente y que solo una copia se integra por célula (42); sin embargo, se ha reportado valores de CPV por encima de 104 copias por cada 104 PBMCs (43), lo que sugiere que podría existir más de una copia por célula.

Este modo de transmisión entre células es más eficiente y limita la exposición del virus al sistema inmunitario. Una vez integrado en el genoma de la célula como provirus, este se multiplica preferentemente por expansión clonal, por mitosis de cada uno de los linfocitos infectados (44,45). La expansión clonal sería la responsable de que la variabilidad del virus sea baja

2.2.5 Proteínas virales

Algunas de las proteínas virales de HTLV-1 son: Gag, Env, Rex, Tax y HBZ (Figura 2b). La proteína Gag de HTLV-1 es una proteína estructural, su procesamiento proporciona la matriz madura, la cápside y la nucleocápside (46). Una vez formado el virión éste cruza el pequeño espacio extracelular de la sinapsis virológica y se fusiona con la membrana plasmática de la célula blanco y libera el ARN y las proteínas virales (5). La

proteína Env de HTLV-1 es la responsable de la interacción con el receptor de glucosa (GLUT-1) para la infección por HTLV-1 de la célula blanco (40).

La proteína Rex de HTLV-1 es un regulador post-transcripcional de la expresión viral y es esencial para la replicación viral en las primeras fases de la infección. Rex se une al ARN mensajero (ARNm) viral y posteriormente promueve que el ARNm sea exportado del núcleo al citoplasma. Se cree que Rex interactúa con las proteínas encargadas del procesamiento del ARNm generando un aumento en la supervivencia del ARNm (47)

Tanto las proteínas de HTLV-1 Tax y HBZ promueven la proliferación de los linfocitos T infectados, pero HBZ tiene un rol opuesto a las demás funciones de Tax (5). Algunas funciones de HBZ son: inhibir la expresión de Tax, promover la transcripción de telomerasa, transcriptasa reversa, inhibir la vía canónica de NF- κ B, inducir la diferenciación a linfocitos T reguladores e inhibe la expresión de IFN-gamma (48). A diferencia de Tax, HBZ mantiene una expresión uniforme en células T infectadas (42) y su expresión sucede en etapas tardías de la infección. En la infección inicial por HTLV-1 a los linfocitos T, Tax juega un rol crucial en la supervivencia de las células infectadas.



Figura 5. Actividad de Tax. Adaptación de Boxus 2008

Tax, una de las proteínas más importantes de HTLV-1, media la activación de diversos genes en la célula infectada, genes involucrados en proliferación, en inhibición de la reparación de ADN, en la producción de citoquinas proinflamatorias, entre otros (49,50) (Figura 5). Una diana de Tax es el factor de transcripción NF- κ B, que puede ser activado tanto por la vía canónica como por la vía no canónica, el cual modula la expresión de proteínas proinflamatorias y supervivencia celular según la vía activada, respectivamente (16) (Figura 6).

La capacidad de Tax de activar ambas vías del factor de transcripción NF- κ B se debe a que interactúa con el complejo Ikk para activar la vía canónica y con el complejo Ikka para activar la vía no canónica. Adicionalmente, Tax se puede unir al factor de transcripción NF- κ B para evitar que I κ B α , el principal inhibidor de NF- κ B, se una, provocando una degradación del mismo. La interacción de Tax genera una activación constitutiva de la cascada de señalización de la vía de NF κ B (32).

El factor de transcripción NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma hasta que sucede la fosforilación de la proteína I κ B α , codificada por el gen NFKBIA. Cuando I κ B α es fosforilado, NF- κ B ingresa al núcleo provocando la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias.

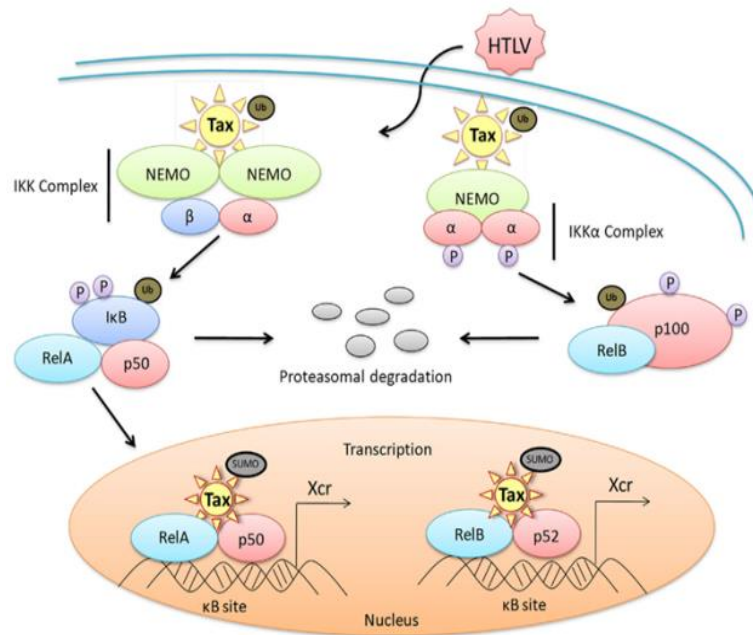


Figura 6. Interacción de la vía de NF- κ B y Tax. Fuente: Currer et al. 2012 (32)

2.2.6 Diagnóstico de la infección por HTLV-1

Existen pruebas serológicas para el diagnóstico de HTLV-1, tales como la prueba de aglutinación de partículas, ensayos de ELISA, inmunofluorescencia indirecta y pruebas de Western blot. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas presentan falsos positivos, resultados indeterminados o en algunos casos no son capaces de distinguir entre HTLV-1 o HTLV-2 (3), por lo que en la mayoría de los casos se solicita una segunda prueba para confirmar el resultado del análisis.

Existen también las pruebas moleculares como la PCR o la qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) como herramientas diagnósticas; en ambos casos el gen blanco para la amplificación es, por lo general, tax. Ambas PCR se pueden utilizar para definir si una persona posee o no la infección (3). En algunos casos se realiza la PCR como prueba confirmatoria. Además de detección viral, la prueba de qPCR permite determinar la carga proviral de HTLV-1

2.2.7 Paraparesia espástica tropical

La paraparesia espástica tropical (PET) o TSP, por sus siglas en inglés, es una enfermedad neurológica progresiva. Se presenta como una inflamación crónica en la médula espinal que genera una disminución en su volumen (5). Si bien existían casos descritos de paraparesia espástica tropical no fue hasta 1986 que se le asoció con HTLV-1 (3) y se le denominó mielopatía asociada a HTLV-1 (HAM, por sus siglas en inglés); posteriormente se acuñó el término HAM/TSP para referirse a la enfermedad.

En su mayoría los pacientes con PET ven afectados ambos miembros inferiores (5). Conforme los años transcurren se observa una paraparesia o parálisis leve de los miembros inferiores (3). Sin embargo, hay pacientes que presentan una rápida progresión de la enfermedad, generándoles problemas tempranos en el desplazamiento. Los estudios indican de manera consistente que una alta carga proviral estaría relacionada con ello (3).

Los pacientes con PET además presentan problemas urinarios, ya sea una hiperactividad de la vejiga o una vejiga flácida; en ambos casos es frecuente detectar infecciones urinarias y hasta problemas renales (5). Adicionalmente, se pueden presentar dolores de espalda, constipación y problemas sensoriales (3).

Para el diagnóstico de un paciente con PET, primero se debe confirmar la infección por HTLV-1. Esto se realiza mediante el uso de pruebas serológicas y moleculares. En segundo lugar es importante descartar otras posibles enfermedades que presentan síntomas muy similares como son la compresión de la médula espinal, la miopatía parasitaria, la esclerosis múltiple, la esclerosis amiotrófica lateral, entre otros (3,5). Estos criterios se ven reflejados en la guía de diagnóstico de la OMS (51) y en la guía de diagnóstico propuesta por Castro-Costra (52). A su vez, se realiza la prueba de Kurtzke para medir la capacidad motora (53).

Se cree que la patogénesis de PET estaría relacionada a la infiltración de linfocitos infectados a la médula espinal, los cuales han proliferado en el torrente sanguíneo (Figura 7). Esta infiltración ocasiona una respuesta inflamatoria, en la cual participan los monocitos/microglías y los linfocitos T citotóxicos. Estas células detectan los antígenos virales presentados por los linfocitos T CD4+ y, como resultado expresan citoquinas proinflamatorias. Los linfocitos T CD4+ infectados también presentan una exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias (54).

Ambos eventos (Infiltración y producción exacerbada de citoquinas) estarían contribuyendo al daño del tejido nervioso circundante, como daño colateral de la infección viral. Por lo tanto, esto estaría contribuyendo a la aparición de los síntomas previamente mencionados.

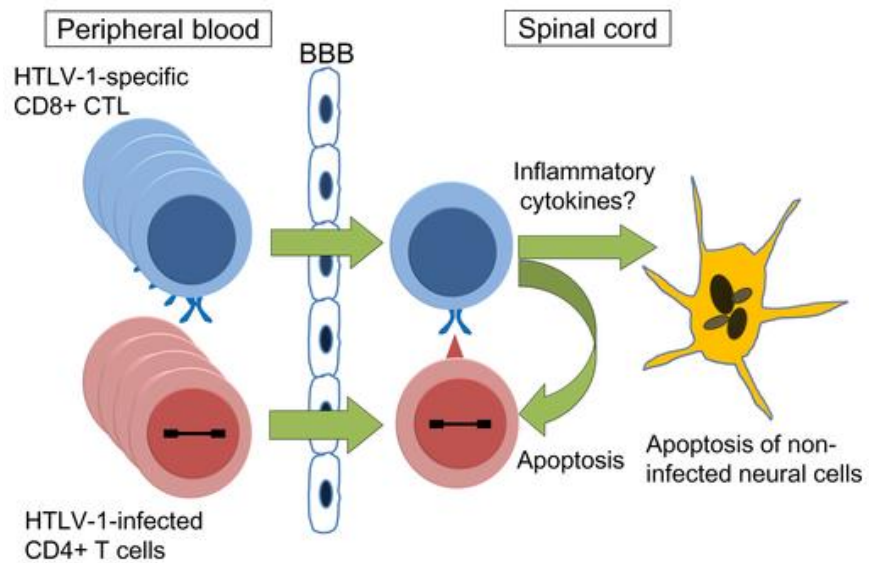


Figura 7. Posible patogénesis de PET. Fuente: Kubota. 2017 (54)

Finalmente, esta liberación de citoquinas producidas por los macrófagos, células NK y demás actores del sistema inmunitario en respuesta de la infección viral; como también, por los linfocitos infectados, es controlada principalmente por la vía de NF- κ B.

2.2.8 Vía de NF- κ B

La vía de NF- κ B es considerada una vía de respuesta rápida de regulación celular, se activa mediante la presencia de estímulos como estrés, presencia de antígenos virales, de especies reactivas de oxígenos. Su activación conlleva a la expresión de proteínas proinflamatorias, como

TNF α , y la síntesis de las proteínas inhibidoras, generando una retroalimentación sobre la actividad de la vía. La inhibición de esta vía se da principalmente por la presencia de proteínas de la familia I κ Bs, las que retienen en el citoplasma a las proteínas de esta vía.(55)

La vía de NF- κ B puede ser activada mediante 2 vías de señalización, la cual involucra a la proteína RelA/p50 en la vía canónica y a la proteína RelB/p52 en la vía no canónica. En el caso de la vía canónica, el complejo IKK fosforila a I κ B generando su ubiquitinación y posterior degradación. El complejo RelA/p50, ahora libre, es capaz de ingresar al núcleo y promover la expresión de genes proinflamatorios (16,55).

Por otro lado, en la vía no canónica, la quinasa NIK activa al complejo IKK α , este fosforila el residuo C-terminal de la proteína p100 promoviendo su ubiquitinación y posterior procesamiento en el proteosoma para la formación de la proteína p52. El complejo RelB/p52 es capaz de ingresar al núcleo y promover la expresión de genes involucrados en la maduración de linfocitos B (16,55).

Si bien la activación de la vía de NF- κ B es un mecanismo de nuestro sistema inmunitario para la lucha contra patógenos, en enfermedades inflamatorias crónicas podría provocar daño celular. En el caso de PET, la sobreactivación de esta vía implica la sobreexpresión de proteínas proinflamatorias, así como, el reclutamiento de macrófagos al lugar de la inflamación, responsables de la explosión (*burst*) oxidativa, donde el conjunto de estos factores puede determinar la destrucción del tejido

nervioso. Esto se puede observar en las complicaciones presentes en las personas con PET, como espasticidad de los miembros inferiores e incontinencias urinaria (3).

2.2.9 Metiltioadenosina

La metiltioadenosina o 5'-metiltioadenosina, o comúnmente nombrado como MTA, es un nucleósido de adenina, en el cual, se ha sustituido el grupo hidroxilo en la posición 5' de la ribosa por un grupo metiltio. Participa en la recuperación de adenina o metionina, por lo que, se le considera como un metabolito intermedio (Figura 8) (23).

In vitro se ha reportado que MTA tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de espermidina y espermina (23,56). Ensayos enzimáticos mostraron que la conversión de espermidina a espermina se ve inhibida por la presencia de MTA. Este actúa como inhibidor competitivo de la transferencia del grupo aminopropil tanto a la espermidina como a la espermina (57,58). Este mismo efecto inhibitorio se ha reportado para la enzima ornitina descarboxilasa (59), la cual inicia la formación de espermina convirtiendo ornitina a putrescina.

Asimismo, se ha reportado *in vitro* que MTA reduce la adquisición de timina en linfocitos estimulados con PHA conforme aumenta su concentración, por lo que, estaría inhibiendo la proliferación celular (60). Adicionalmente, se ha reportado que la MTA tendría un efecto regulador sobre la apoptosis, debido a que en hepatocitos de ratón reduce la actividad de la caspasa 3, caspasa asociada a la muerte celular programada. A su vez,

reduce los niveles de oligonucleosomas presentes durante la apoptosis. Por otro lado, en células tumorales humanas de hígado se observa el efecto contrario, es decir, un efecto pro apoptótico en células tumorales (61).

En modelos animales de enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple, se encontró que MTA posee un efecto neuro-protector y aminora el desarrollo de síntomas, respectivamente. El efecto neuro-protector está relacionado a una disminución de la apoptosis en neuronas y el incremento de células dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Mientras que en esclerosis múltiple se observó que MTA disminuyó hasta en 2 veces la desmielinización (25,62).

Se le atribuye un efecto antiinflamatorio debido a que inhibe la activación de la vía de NF- κ B, mediante el incremento de la proteína I κ B- α y la disminución de TNF- α (63). Sin embargo, se ha observado también que MTA inhibe la vía de NF- κ B mediante la reducción de Akt fosforilado en la vía de señalización Akt/PKB (24).

Finalmente, se ha reportado que este efecto inhibitorio no sería citotóxico debido a que células estimuladas con mitógenos posttratamiento con MTA proliferaron de manera muy similar a aquellas sin tratar (64).

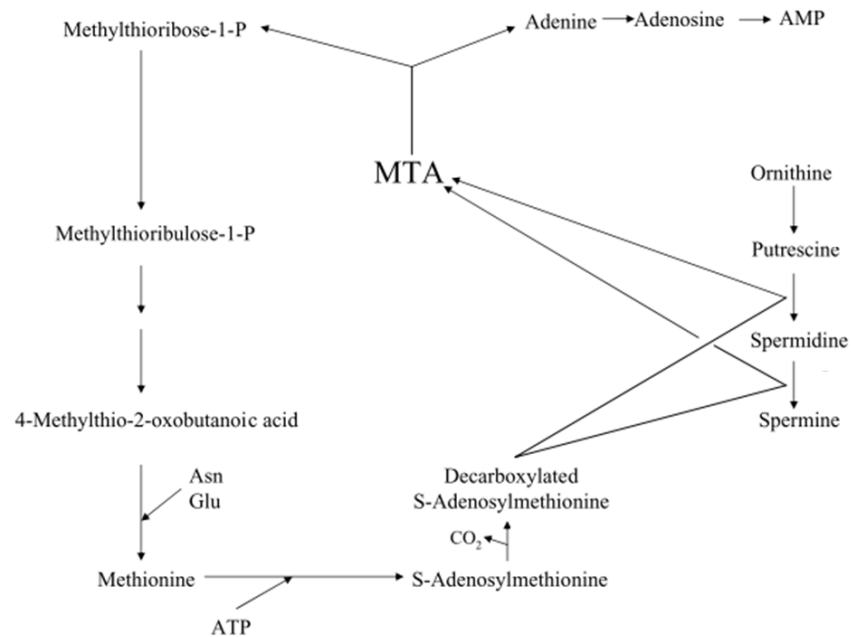


Figura 8. Formación de metiltioadenosina. La formación de MTA parte de metionina. La conversión de metionina a S-adenosilmetionina está catalizada por la enzima metionina adenosiltransferasa con el uso de un ATP. Este producto se descarboxila a través de la AdoMet descarboxilasa a S-Adenosilmetionina descarboxilado. El cual, provee el grupo propilamina necesario para la formación de putrescina y espermína, en dos reacciones separadas. Luego de donar el grupo propilamina, el metabolito resultante es MTA. Este puede ingresar tanto a la vía de salvataje de Adenina o Metionina. Fuente: Avila, et al. 2003. (23)

2.3 Justificación del estudio

En la actualidad en el Perú se estima que hay entre 150 000 a 450 000 infectados por HTLV-1 (1), lo cual supera el número de casos reportados por VIH, que suman alrededor de 70 000 (2). Las personas infectadas con HTLV-1 que presentan PET, muestran dificultades en sus movimientos que muchas veces los imposibilita de realizar sus labores diarias y requieren el cuidado y atención de otras personas. Esto genera un problema social dado que conlleva a un menor ingreso económico para la familia, generando mayor pobreza en las familias afectadas.

Actualmente no existe un tratamiento capaz de revertir los daños que se presentan en los pacientes con PET, solo existe un tratamiento sintomático con

corticoides que intenta mejorar la calidad de vida. Al ser PET una enfermedad progresiva, la persona afectada presenta un impacto psicológico y también un deterioro motor que dificulta sus movimientos y que en algunos casos lo obligará a desplazarse en silla de ruedas o lo postra en una cama. La búsqueda de compuestos que ayuden a aliviar los síntomas o detener la progresión de la enfermedad es de necesidad en este contexto.

Por ello, se evaluará *in vitro* el efecto del compuesto metiltioadenosina, del cual se ha reportado tener un impacto sobre la regulación de la vía de NF- κ B, vía que se encuentra muy activa en los pacientes con PET. Ello podría reducir los procesos patológicos de esta enfermedad y nos permitirá contribuir con las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento, permitir estudios posteriores para el control del virus en pacientes con PET y en un futuro no solo para mejorar la calidad de vida.

2.4 Hipótesis

El tratamiento con metiltioadenosina disminuye el proceso inflamatorio regulado por la vía de NF- κ B en pacientes con paraparesia espástica tropical infectados con HTLV-1.

2.5 Objetivo

2.5.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad de la vía de NF- κ B *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de pacientes con Paraparesia Espástica Tropical (PET) en respuesta al tratamiento con metiltioadenosina (MTA).

2.5.2 Objetivos específicos

- Aislar y cultivar PBMC en presencia de MTA
- Evaluar la actividad de NF- κ B en PBMC de pacientes con PET en presencia de MTA, mediante la detección del factor de transcripción translocado al núcleo celular
- Determinar el cambio en la expresión relativa de genes regulados por la vía de NF- κ B en PBMC de pacientes con PET en presencia de MTA
- Cuantificar los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias en PBMC de pacientes con PET en presencia de MTA

III. Metodología

3.1 Diseño del estudio

La presente investigación es un estudio transversal que tiene como objetivo evaluar la actividad de la vía de NF- κ B en presencia del compuesto metiltioadenosina en células de pacientes con PET. Para determinar si MTA tiene actividad moduladora de esta vía, el estudio se ha dividido en 2 Fases.

La Fase I determina el impacto de MTA sobre: I) la actividad de la vía NF- κ B; II) la expresión de genes vinculados a la vía de NF- κ B; y III) los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias, en células de pacientes con PET. A su vez, se utilizará células de individuos sanos como control negativo de la infección.

La Fase II busca fortalecer y consolidar los hallazgos encontrados en la Fase I, mediante la evaluación por citometría de IFN- γ intracelular y la cuantificación de la actividad de la vía de NF- κ B en células inducidas a inflamación y células de pacientes con PET. Se utilizará un grupo nuevo de muestras de pacientes con PET e individuos sanos.

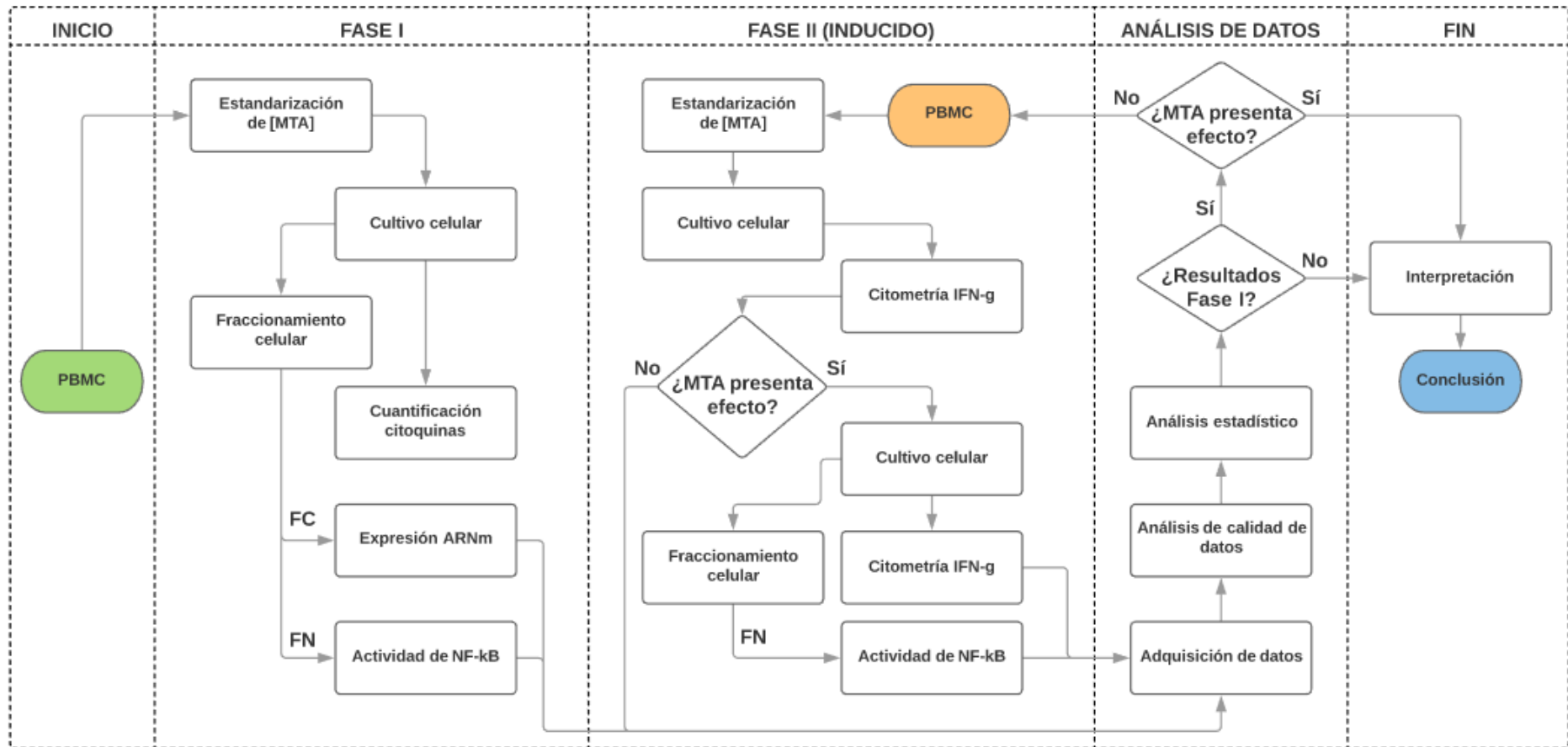


Figura 9. Flujoograma del estudio. Inicio, reclutamiento de pacientes con PET y extracción de PBMC. Fase I, Se determinará la concentración de MTA a emplear en el cultivo celular. De este se obtendrá el sobrenadante para la cuantificación de citoquinas y se fraccionará el pellet celular para la obtención de la fracción nuclear (FN) y la fracción citoplasmática (FC). De la FC se medirá la expresión de genes y de la FN la actividad de la vía de NF-kB. Los resultados serán evaluados en el Análisis de datos. Fase II, se reclutará un nuevo grupo de pacientes con PET y se estandarizará una concentración óptima de MTA. A diferencia de la Fase I, se utilizará la medición por citometría de IFN- γ e intracelular como criterio de verificación del efecto de MTA. Adicionalmente, se medirá nuevamente la actividad de NF-kB. Finalmente, se discutirá los hallazgos de la Fase I y II a manera de dilucidar el efecto modulador de MTA sobre la inflamación presente en los pacientes con PET.

3.2 Población

La población de estudio corresponde a individuos infectados con HTLV-1 pertenecientes a la cohorte de seguimiento clínico de HTLV-1 del Instituto de medicina tropical Alexander von Humboldt, Lima, Perú.

Todo individuo participante de este proyecto proviene del estudio «Modulación de la vía de NFkB en células de pacientes infectados por HTLV-1 como blanco para el tratamiento de paraparesia espástica tropical» con código SIDISI: 67039, el cual, cuenta con aprobación del Comité de Ética en investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Todo participante firmó voluntariamente el consentimiento informado y cumplió con los criterios de inclusión y exclusión establecidos (Tabla 2, 3).

Tabla 2. Criterios de Inclusión y Exclusión de pacientes con PET

Criterio de inclusión	Criterio de exclusión
• Individuos HTLV-1 positivos, determinados por ELISA y PCR, con diagnóstico de mielopatía dictaminada en el IMTAvH	• Pacientes HTLV-1 positivos, con diagnóstico clínico no definido
• Individuos HTLV-1 positivos, que no hayan recibido tratamiento para la enfermedad	• Pacientes HTLV-1 positivos, con coinfecciones por <i>Strongyloides stercoralis</i> o escabiosis
• Individuos HTLV-1 positivos, que presenten una escala de kurtzke entre 0 a 5	• Pacientes con Dermatitis Infecciosa • Pacientes con Tuberculosis activa
• Individuos de 18 a 60 años de edad que firmen el consentimiento informado para el uso de sus muestras en el presente estudio	• Pacientes con enfermedades inflamatorias conocidas, como: Síndrome de Sjögren, Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Síndrome de Ojo seco, Tiroiditis de Hashimoto

Tabla 3. Criterios de Inclusión y Exclusión de individuos sanos

Criterio de inclusión	Criterio de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> • Individuos HTLV-1 negativos, determinados por ELISA + PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes HTLV-1 positivos, con coinfecciones por <i>Strongyloides stercoralis</i> o escabiosis, HIV, Sifilis
<ul style="list-style-type: none"> • Individuos voluntarios de Lima entre 18 a 60 años de edad que firmen el consentimiento informado para el uso de sus muestras en el presente estudio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con Dermatitis Infecciosa, Tuberculosis
<ul style="list-style-type: none"> • Sin indicios de enfermedad neurológica (Al momento del screening basal no tenga síntomas neurológicos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Individuos con enfermedades inflamatorias conocidas como: Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Tiroiditis de Hashimoto
	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo de fármacos en los últimos 3 meses: esteroides orales y/o endovenosos, antirreumáticos, inmunosupresores o tratamiento para cáncer (Pueden estar tomando AINES)
	<ul style="list-style-type: none"> • Cuadro febril en el último mes

3.3 Muestra

La muestra son PBMC de pacientes con paraparesia espástica tropical, de los cuales se obtuvieron 18ml de sangre venosa a través de una punción en el brazo. Se analizó el universo de la base de datos existente de la cohorte de seguimiento para determinar quiénes podrían cumplir los criterios de inclusión. Se contactó vía telefónica a un total de 145 individuos, de los cuales solo 86 se presentaron para la evaluación clínica. Solo 25 pacientes cumplían con los criterios de inclusión y exclusión, pero solo 20 individuos firmaron el consentimiento informado indicando que participarían de

estudio. Los pacientes fueron evaluados por un médico infectólogo y un médico neurólogo.

Para la Fase I del estudio se evaluó 16 pacientes con PET y 4 individuos sanos. En la Fase II, participaron 3 pacientes con PET y 3 individuos sanos. Con este N muestral se podrían encontrar diferencias de *fold change* de 2 con un valor de significación de $\alpha=0.001$ y un poder del 80% sobre la expresión de los genes relacionados a la vía de NF- κ B (65). A su vez, permitía realizar las comparaciones estadísticas sobre la actividad de la vía y los niveles de citoquinas.

3.4 Procedimientos y técnicas

El presente estudio cuenta con dos Fases: I) Determinación el impacto de MTA sobre la vía de NF- κ B en PBMC de pacientes con PET; y, II) Fortalecimiento y consolidación de la evaluación del efecto de MTA. Existen procedimientos generales para ambas fases, y otros exclusivos para cada fase.

3.4.1 Procedimientos generales:

- Aislamiento de PBMC
- Cultivo celular
- Efecto dosis respuesta de MTA
- Extracción de la fracción nuclear y citoplasmática
- Cuantificación de la actividad de la vía de NF- κ B.

3.4.1.1 Aislamiento de PBMC

Se aisló los PBMC provenientes de 18ml de sangre venosa por medio del método de gradiente con Ficoll-Paque. Primero se diluyó la sangre con solución Hank, seguidamente se colocó esta mezcla en tubos con solución Ficoll-Paque y se centrifugó a 400g por 25 minutos. Se retiró

la interfase correspondiente a los PBMC y se la colocó en un nuevo tubo con solución Hank. Se procedió a centrifugar a 500g por 15 minutos, luego se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 1ml de solución Hank. Finalmente, los PBMC fueron congelados en nitrógeno líquido hasta el día de su empleo para los ensayos de cultivo celular.

3.4.1.2 Efecto dosis respuesta de MTA

La determinación de la concentración de MTA se realizó para poder evaluar su efecto modulador de la actividad de la vía de NF- κ B. Se determinó 2 concentraciones de MTA, una para cada Fase del estudio.

Para la Fase I del estudio, se determinó la concentración de MTA mediante la evaluación de los siguientes parámetros: Conteo celular y Porcentaje de viabilidad. Para ello, se cultivó PBMC de 5 individuos sanos en presencia de diferentes concentraciones de MTA reportadas en la literatura: 10, 100 y 200 μ M por un lapso de 24 horas. Posterior a este tiempo, se tomó una alícuota y determinó la viabilidad y número total de células mediante el empleo azul de tripán.

En Fase II del estudio, se determinó la concentración de MTA al evaluar los siguientes parámetros: Conteo celular, Porcentaje de viabilidad y Concentración letal media (LC50). Se cultivó PBMC de 2 individuos sanos en presencia de diferentes concentraciones de MTA (10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 5000, 10 000, 20 000, y 30 000 μ M) por un lapso de 3, 6 y 24 horas. Se calculó los parámetros de conteo celular y porcentaje de viabilidad mediante el mismo procedimiento que en la

primera sección. Se determinó la LC50 al graficar el porcentaje de muerte celular versus el logaritmo de la concentración.

Finalmente, se determinó la concentración de MTA a ser utilizada tomando en cuenta solo las 3 y 6 horas tratamiento, correspondientes a tiempo de activación de la vía NF- κ B y a la exacerbada respuesta de la vía de NF- κ B en los pacientes con PET, respectivamente. Se cultivó 24 horas con fines de comparación con la Fase I del estudio.

3.4.1.3 Cultivo celular

Se descongeló los PBMC de los pacientes para el cultivo celular en presencia o ausencia de tratamiento con MTA. Para ello, se cultivó 4 pozos con 250 000 células en 100 μ L de RPMIc. Se añadió 150 μ L de RPMIc o 150 μ L de RPMIc con la concentración de MTA establecida (10 o 500 μ M). Adicionalmente, se cultivó células con 10 μ M de PDTC como control de inhibición de la vía de NF- κ B. Posteriormente se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas para la concentración de 10 μ M y 6 horas para la concentración de 500 μ M. Al cabo de este tiempo, se retiró el sobrenadante y se almacenó para su posterior uso en el ensayo de citoquinas. El pellet celular se destinó para el fraccionamiento celular.

3.4.1.4 Extracción de la fracción nuclear y citoplasmática

Para la extracción de la fracción nuclear y citoplasmática se utilizó el pellet celular proveniente del cultivo celular en presencia o ausencia de MTA. Se utilizó el kit Paris™ (Life Technologies, CA USA). Brevemente, se mezcló el pellet celular con 500 μ L de PBS 1X frío y se centrifugó a 500g por 5 minutos. Al cabo de los 5 minutos se decantó el sobrenadante,

se homogenizó con 300 μ L de *Cell Fractionation buffer* y se incubó por 10 minutos a 4°C. Después de centrifugar a 500 g por 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción citoplasmática. Para obtener la fracción nuclear, se agregó 300 μ L de *Cell Disruption buffer* y homogenizó vigorosamente con vortex. En caso de existir pellet celular se sonicó 3 veces la muestra a 30% de potencia por 3 segundos con 3 segundos de reposo entre cada ciclo. Todo el proceso se realizó en hielo. Una vez separada las fracciones, de la fracción citoplasmática se aisló el ARN para los ensayos de expresión y de la fracción nuclear se midió la actividad de la vía NF- κ B.

3.4.1.5 Cuantificación de la actividad de la vía de NF- κ B

Se midió la actividad de la vía de NF- κ B mediante el kit TransAM NF- κ B Family (Active Motif, CA USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en cada pozo de reacción hay adheridos oligonucleótidos correspondientes a la secuencia que es reconocida por el factor de transcripción. Posterior a la interacción, se detecta la presencia del factor de transcripción mediante el uso de un anticuerpo primario específico, en este caso para la proteína p65 (RelA) o p50, y un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Finalmente, mediante el uso del sustrato y la solución que detiene el proceso enzimático se puede medir la absorbancia.

Se agregó 2 μ g de proteína de cada muestra a los pozos correspondientes. Se procedió a agregar el *binding buffer* y se incubó por 1 hora. Al finalizar la incubación, se agregó el anticuerpo primario y se

incubó por 1 hora. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario e incubó por 1 hora. Finalmente, se detuvo la reacción y se leyó a 450 nm y con una longitud de onda de referencia de 650 nm.

Se calculó el porcentaje de actividad de la vía de NF- κ B respecto del control positivo del kit (Extracto nuclear de la línea celular Raji). Para ello, se calculó la absorbancia promedio de cada muestra y, a continuación, se dividió este valor entre el valor de OD de Raji.

3.4.2 Procedimientos exclusivos Fase I:

- Extracción de ARN
- Ensayo de control de calidad de ARN
- Ensayo de expresión de genes de la vía de NF- κ B
- Contribución de ADN genómico
- Cuantificación de citoquinas pro y antiinflamatorias.

3.4.2.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el kit Paris™ (Life Technologies, CA USA). Se siguió el protocolo sugerido: Se agregó 150 μ L de buffer de lisis y de etanol absoluto a la fracción citoplasmática. Luego de homogenizar se colocó en la mezcla en el *filter cartridge* y se centrifugó a 10 000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, se lavó 2 veces con *Wash solution*. Se eluyó el ARN con 20 μ L solución de elución a 90°C y por segunda vez con 10 μ L, volumen final 30 μ L. El ARN obtenido se cuantificó mediante flurometría y se almacenó a -80°C hasta el día de su uso.

3.4.2.2 Ensayo de control de calidad del ARN

Una vez extraído el ARN, se utilizó 2 muestras para observar la calidad del ARN. Se utilizó el kit *RT² PCR Array Human RNA QC* (Qiagen, Alemania), el cual permite evaluar la presencia de ADN genómico, la eficiencia en la síntesis de ADNc y la expresión de 2 genes de referencia, de alta y baja expresión. Para ello, se trató el pool de ARN con 0.8 µL de Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific, MA USA) y posteriormente se procedió a la síntesis de ADNc con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Suiza). Una vez obtenido el cDNA, se procedió con la preparación del master mix, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El procedimiento se realizó mediante el siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C y 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

3.4.2.3 Ensayo de expresión de genes de la vía de NF-κB

Para medir la expresión de los genes relacionados a la vía de NF-κB se empleó el kit *RT² Profiler™ PCR Array Human NFκB Signaling Pathway* (Qiagen, Alemania). Dado que la finalidad fue observar el comportamiento de la expresión de genes modulados por la vía de NF-κB de los pacientes infectados en presencia de MTA en conjunto, y a raíz de la baja cantidad neta de ARN obtenido, se hicieron *pool* de muestras al azar. Se obtuvieron un total de 4 *pool* donde cada *pool* correspondió a 4 muestras de pacientes con PET. Seguidamente se realizó el tratamiento con 1µL de Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific, MA USA) y la conversión a ADNc con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Suiza). Se siguió las indicaciones del fabricante para realizar el

array, y se realizó el siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C y 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

3.4.2.4 Contribución del ADN genómico

Se procedió a realizar un ensayo de PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) para verificar la presencia de ADN genómico contaminante tanto en el ensayo de calidad del ARN como el ensayo de expresión de genes. Dado que el ensayo de calidad del ARN se realizó con un *pool* de 2 muestras y la expresión de ARNm con un *pool* de 4 muestras, se procedió a verificar el ensayo de expresión con 2 *pool* similar a los previamente empleados. Se utilizó 2 genes de referencia (B2M, GAPDH), y para cada uno se realizó el ensayo por triplicado, a su vez, por triplicado un control sin transcriptasa reversa con la finalidad de verificar la expresión de los genes y corroborar si hubo contaminación por ADN genómico (ADNg). Se siguió el mismo protocolo de los ensayos anteriores.

Se calculó la cantidad inicial de ADNc respecto de ADNg al inicio de la RT-PCR, y por consiguiente, determinar la contribución de ADNg en la expresión de los genes. Primero se determinó la diferencia de Ct entre el control -RT (Amplificación de ADNg) y el Ct correspondiente al gen de referencia de interés (H_{ki}) (Ecuación 1).

$$(1) \quad \Delta Ct = Ct_{-RT} - Ct_{H_{ki}}$$

Seguidamente se calculó la cantidad de productos de amplificación (E_{Amp}). Para ello, se elevó la eficiencia de la RT-PCR, se asumió 100% de eficiencia ($E=2$), a la diferencia de Ct obtenida (Ecuación 2).

$$(2) \quad E_{Amp} = 2^{\Delta Ct}$$

Finalmente, el valor obtenido representa cuanto más producto inicial (tiempo=0) hay de ADNc respecto a ADNg.

3.4.2.5 Cuantificación de citoquinas pro y antiinflamatorias

La cuantificación de citoquinas se realizó por medio de la plataforma luminex con el empleo del kit *Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 18-Plex Human ProcartaPlex™ Panel* (Thermo Fisher Scientific, MA USA). Para ello se empleó el sobrenadante de cultivo que previamente se había retirado y almacenado. Se procedió a realizar las diluciones de los *beads* de las 18 citoquinas para las curvas estándar (Anexo 2) como se indica en el manual. Seguidamente se procedió a agregar 50µL de los *beads* a cada pozo, así como, de las muestras y estándares. Al cabo de 2h de incubación, se lavó la placa 2 veces con el *washing buffer* y se colocó el anticuerpo de detección e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo se agregó estreptavidina-PE e incubó por 30 minutos y se lavó la placa 2 veces. Se incubó por 5 minutos con el *Reading buffer* y se adquirió en el equipo.

3.4.3 Procedimiento exclusivo Fase II:

- Detección de IFN- γ intracelular

3.4.3.1 Detección de INF- γ intracelular

Se evaluó el porcentaje de células CD45⁺ y CD4⁺ productoras de IFN- γ intracelular en tres individuos sanos inducidos a inflamación y en 3 pacientes con PET, en presencia y ausencia de MTA. Para ello, se cultivó 3 pozos por individuo, los cuales fueron: PBMC sin inductor ni tratamiento, PBMC con inductor, y PBMC con inductor y tratamiento. Se indujo inflamación con 0.081 µM de forbol 12-miristato 13-acetato o PMA, por sus siglas en inglés; y 1.34 µM de Ionomicina (Invitrogen, MA, USA) por 4 horas. Posteriormente, se trató con 500 µM de MTA por 6

horas. Adicionalmente, se usó Anti-CD3 en vez de PMA, como control de baja inducción.

Al cabo de este tiempo se adicionó 0.25 μ L de brefeldina A (1 μ g/ml) por 4 horas. Seguidamente se cosechó las células y se realizó un lavado con PBS 1X. Se alicuotó 20 μ L y adicionó el marcaje superficial Anti-CD45 y Anti-CD4 (BD Biosciences, CA, USA) e incubó por 30 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con solución de tinción (2% suero bovino fetal) a 500g por 10 minutos. Se permeabilizó la membrana celular con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, CA, USA) incubó por 20 minutos a 4°C y se centrifugó a 500g por 5 minutos. Se añadió Anti-IFN- γ (BD Biosciences, CA, USA) e incubó por 30 minutos a 4°C. Se realizó un lavado y resuspendió con 300 μ L de solución de tinción. Finalmente, se adquirió los eventos en el citómetro equipo FACSCalibur™ BD.

3.5 Bioseguridad

Todos los ensayos celulares y aquellos que involucraron material biológico siguieron las normas para el trabajo con HTLV-1 determinadas por las siguientes entidades: Organización Mundial de la Salud (OMS) (66), Los estándares de bioseguridad de Canadá (CBS) (67), y el Centro de Control y prevención de enfermedades (CDC) (68).

3.6 Consideraciones éticas

El presente estudio con código de inscripción: 101495, cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.7 Plan de análisis

Previo al análisis estadístico, se realizó una depuración de datos. Este consistió en excluir aquellos datos que no cumplieron con alguno de los siguientes criterios: i) para el ensayo de activación de NF- κ B, aquellas muestras que en ausencia de tratamiento presentaron valores por debajo del límite de detección del kit; ii) para el ensayo de expresión de ARNm, presencia de contaminación determinada por un análisis de picos de *meltn*; y iii) para el ensayo de citoquinas, aquellas muestras que presentaron valores por debajo del límite de detección del kit.

Se empleó la prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de los datos obtenidos. Dependiendo del resultado se utilizó la prueba paramétrica T Student o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se eligió un diseño experimental pareado para los análisis, dado que el objetivo fue comparar los niveles de activación de la vía de NF- κ B y citoquinas entre células tratadas con MTA y no tratadas. La comparación con individuos sanos se realizó con un diseño experimental no pareado.

El análisis de la expresión de los genes medidos por el sistema de *Signaling Pathway PCR Array* se analizó con el programa qbase+ (69), donde se realizó un cálculo de la expresión relativa (RQ), expresión relativa normalizada (NRQ) y la expresión relativa normalizada calibrada (CNRQ), donde se utilizó la media global como método normalizador (70).

Para el cálculo de la LC50, se empleó una regresión no lineal. El análisis para el ensayo de citometría (IFN- γ intracelular) se hizo con el programa FlowJo X. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism V.7.

IV. Resultados

A continuación, se presentan los resultados, los cuales, están divididos en dos partes, correspondientes a cada fase del estudio. La primera fase, buscó determinar el impacto de MTA sobre la actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET, mientras que la Fase II, buscó fortalecer y consolidar los resultados.

En la Fase I, se determinó una concentración de MTA, la cual, sirvió para incubar los PBMC de los pacientes con PET. Posteriormente, se cosechó y fraccionó las células para obtener la fracción citoplasmática y nuclear. Con estas fracciones se midió la expresión de ARN (Fracción citoplasmática) y la actividad de la vía de NF- κ B (Fracción nuclear). A su vez, se midió las citoquinas proinflamatorias en el sobrenadante de cultivo.

Los resultados de la Fase I sentaron las bases para la Fase II. La cual buscó fortalecer y consolidar los resultados encontrados. En esta se evaluó el porcentaje de células productoras de IFN- γ , así como, la actividad de la vía de NF- κ B de pacientes con PET en presencia de una nueva concentración óptima de MTA.

En la parte final de esta sección se encuentra una tabla resumen, en la cual, se presenta los resultados más resaltantes tanto de la Fase I como de la Fase II.

4.1 Resultados correspondientes a la Fase I

4.1.1 Determinación de la concentración de MTA

Se observó que ninguna concentración de MTA (10, 100 y 200 μ M) disminuyó significativamente el número total de células (Figura 10A), ni la viabilidad celular (Figura 10B). Se evidenció un posible efecto concentración dependencia para el parámetro «número de células vivas», siendo 10 μ M la concentración que menos afectaría a las células de individuos sanos.

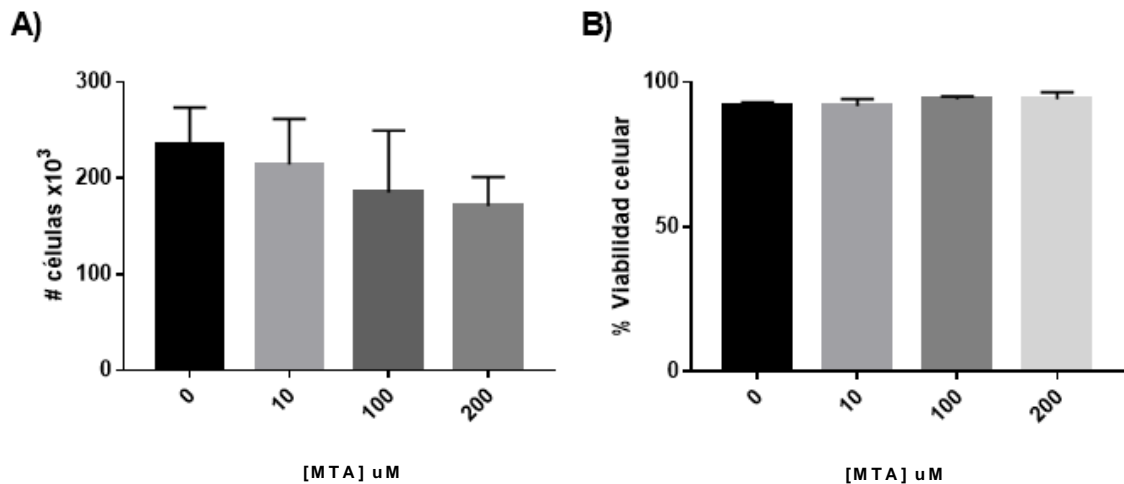


Figura 10. Efecto de MTA sobre PBMC de individuos sanos. A) Número de células viables. B) Porcentaje de viabilidad celular. Se cultivó PBMC de 5 individuos sanos con diferentes concentraciones de MTA (10, 100 y 200 μM) por un lapso de 24 horas. Se utilizó azul de tripán para realizar el conteo celular y determinar el porcentaje de viabilidad con la cámara de Neubauer.

4.1.2 10 μM de MTA reduce la activación de la vía de NF- κB

Una vez aisladas las fracciones nucleares de las muestras de los pacientes con PET en ausencia y presencia de MTA, se midió la actividad de NF- κB . Solo aquellos pacientes que presentaron valores detectables de actividad de la vía de NF- κB en ausencia de tratamiento con MTA fueron considerados para los análisis.

Se evidenció que la actividad de la vía de NF- κB en los pacientes con PET varía entre los individuos evaluados entre 2 a 60% ($M=43.13$; $SD=16$). De los siete pacientes evaluados, solo un individuo mostró un incremento de su actividad postratamiento con 10 μM de MTA. Además, este paciente presentó una actividad basal menor que la de los individuos sanos (Figura 11A), lo que representa un comportamiento anómalo y sugiere que los resultados obtenidos con esta muestra son producto de un artefacto. Por ello, este paciente se excluyó de los análisis posteriores.

En cuanto a los demás pacientes, se observó que todos disminuyeron en diferente grado su actividad post tratamiento con MTA; esta reducción en la

actividad fue significativa ($p=0.029$). De igual forma el tratamiento con PDTC, control de inhibición, mostró una reducción significativa de la actividad en comparación con los pacientes sin tratamiento (Figura 11B)

Por otro lado, la media de la actividad de la vía de NF- κ B en ausencia de MTA de los individuos sanos ($M=10.34$; $SD=5.47$) fue significativamente menor que la media de los pacientes con PET ($M=43.13$; $SD:16$) (Figura 11B).

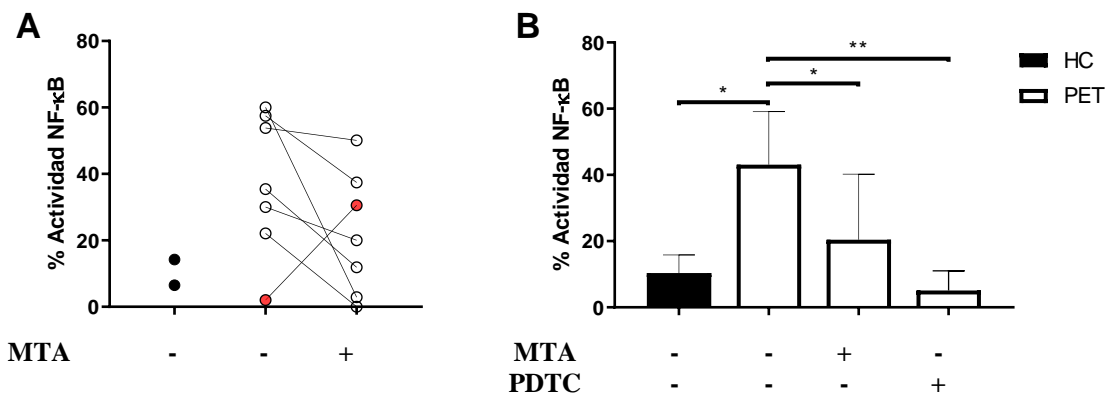


Figura 11. Actividad de la vía de NF- κ B. Se cultivó PBMC de individuos sanos y pacientes con PET en presencia o ausencia de 10 μ M de MTA o PDTC por 24 horas y se midió la actividad de la vía. A) Actividad de la vía de NF- κ B individual. Los puntos negros representan a los individuos sanos ($n=2$) y los puntos blancos a los pacientes con PET ($n=7$). El punto rojo representa al paciente con actividad anómala. B) Actividad de la vía de NF- κ B. La columna color negro representa a los individuos sanos ($n=2$), mientras las columnas blancas a los pacientes con PET ($n=6$). HC, individuos sanos; PET, paraparesia espástica tropical; MTA, metiltioadenosina; PDTC, pirrolidina ditiocarbamato. * $p<0.05$; ** $p<0.005$.

4.1.3 Calidad de ARNm

Una vez realizada la extracción de ARN se realizó un análisis de calidad del ARN para luego proceder con el análisis de expresión. Se construyó un pool de 2 muestras de ARN al azar y se evaluó por cuadruplicado.

Se observó que el pool de ARN tuvo una Ct promedio de 27.34 para el gen ACTB de alta expresión (*Housekeeping 1*), y 34.58 para el gen HPRT1 de baja expresión (*Housekeeping 2*). A su vez, se observó que hubo amplificación del control positivo. Tanto para el control sin transcriptasa reversa como para el

control sin muestra, donde no se espera amplificación por PCR, no se observó un Ct inferior a 35. Para el control de ADN genómico se evidenció un Ct = 33. Todos estos parámetros se encuentran dentro de lo establecido por el fabricante, lo cual, evidencia una buena calidad del ARN.

4.1.4 Los PBMC de los pacientes con PET incubados con MTA no muestran disminución en la expresión de genes regulados por la vía de NF- κ B

Mediante la utilización de placas de Superarray se midió la expresión relativa de 84 genes relacionados con la vía de NF- κ B en PBMC pre y postratamiento con 10 μ M de MTA. Los genes evaluados se distribuyen en 3 categorías: I) Genes relacionados a la señalización de la vía de NF- κ B, desde genes que codifican a los TLR hasta los propios genes del factor de transcripción; II) Genes que se expresan como respuesta a la activación de la vía de NF- κ B, principalmente genes de citoquinas; y III) Otros genes involucrados, como genes que codifican kinasas y otros factores de transcripción. La lista completa de genes evaluados se describe en el Anexo 1.

De estas 3 categorías, la más relevante para el estudio fue la segunda. Esto debido a que son los genes regulados por el factor de transcripción (NF- κ B). No se observó una reducción significativa de la expresión relativa de los genes regulados por la vía de NF- κ B postratamiento con MTA. Dentro de este grupo de genes se encuentran lo siguiente NFKBIA, IL-8, IFN- α , GM-CSF, TNF y TNF- β (Figura 12), entre otros.

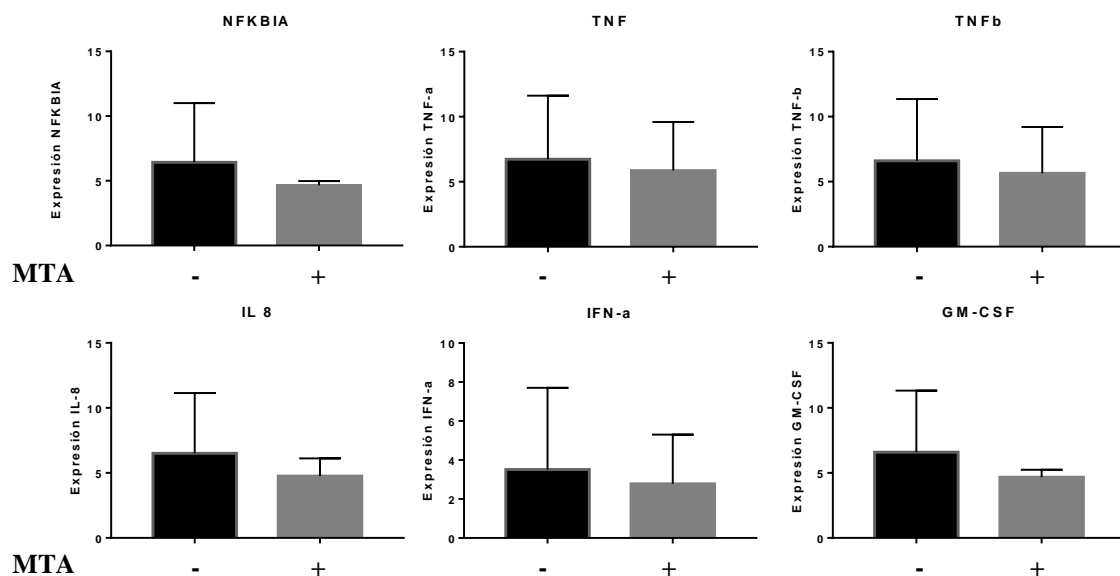


Figura 12. Expresión de genes regulados por la vía de NF- κ B. La expresión relativa de los genes se estandarizó por medio de la media global. El ensayo fue realizado por triplicado y se calculó los valores de expresión relativa (CNRQ) para cada uno de los genes mostrados. NFKBIA, gen inhibidor de la vía de NF- κ B; TNF, factor de necrosis tumoral; TNF-b, factor de necrosis tumoral beta; IL-8, interluquina 8; IFN- α , interferón alpha; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. MTA, metiltoadenosina. Los datos están representados en media más la desviación estándar.

4.1.5 Contribución del ADN genómico

La medición de genes mediante el superarray cuenta con controles positivos, con 5 genes de referencia y un control de contaminación de ADN genómico. El control de ADN genómico consiste en oligos fijados en un pozo de la placa, los cuales, están diseñados para hibridar a una región no codante conservada entre especies. Sin embargo, el ensayo no cuenta con un control negativo para transcriptasa reversa *per se*, para ello, se realizó un RT-PCR.

Se observó tanto para el *pool* de 2 muestras como el de 4 muestras que el control sin transcriptasa reversa presentó valores de Ct iguales a 35 (Anexo 3). También se observó la presencia de un pico de *melting* a la misma temperatura que los genes de interés (Anexo 2). A su vez, se calculó la diferencia entre las cantidades iniciales de ADN genómico y ADNc, con el objetivo de determinar la contribución del ADN genómico a la expresión de genes. Se observó que la cantidad inicial de ADNc es 8500 veces más que la cantidad inicial de ADN

genómico para el gen GAPDH y 189 258.68 veces más para el gen B2M en el pool de 4 muestras (Anexo 3). Ello indicaría que la posible contaminación de ADN genómico sería mínima y no contribuiría significativamente a la expresión de los genes.

4.1.6 MTA no disminuye la respuesta Th1 y Th2

Se midió los niveles de 18 citoquinas en el sobrenadante de cultivo. De las 18 citoquinas se excluyeron 9, IL-9, IL-27, IL-23, IL-22, IL-21, IL-17A, IL-5, IL-4 y IL-12p7, por mostrar valores por debajo del límite de detección tanto para las células tratadas como para las no tratadas. A su vez, se excluyó las citoquinas IL-1 β , IL-10, IL-18, por presentar valores por debajo del límite de detección en más del 50% de las células no tratadas.

Se comparó los niveles de las citoquinas GM-CSF, TNF- α , IL-6, IL-2, IL-13 y IFN- γ entre PBMC incubados en ausencia o presencia de MTA. Se observó que para ninguna de las citoquinas evaluadas hubo una reducción estadísticamente significativa de sus niveles (Fig. 14).

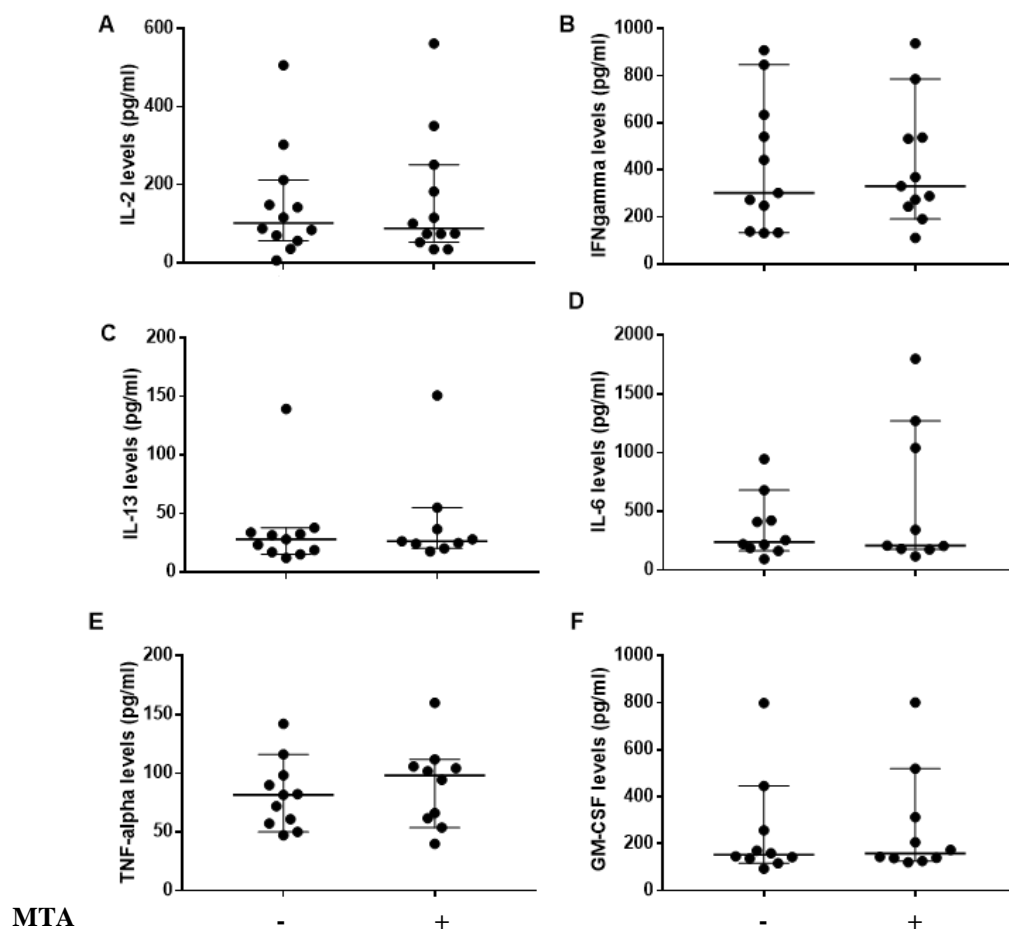


Figura 13. Cuantificación de los niveles de citoquinas proinflamatorias. A) IL-2, B) IFN- γ , C) IL-13, D) IL-6, E) TNF- α , F) GM-CSF. La medición de las citoquinas se realizó a muestras de 16 pacientes con PET, de los cuales, para la citoquina IL-2 se analizó muestras de 12 pacientes con PET y para el resto de las citoquinas, 10 pacientes con PET. MTA, metiltioadenosina.

4.2 Resultados correspondientes a la Fase II

Los hallazgos previos sugirieron la posibilidad que MTA tenga un efecto antiinflamatorio sobre las células de pacientes con PET. Por ello, con la idea de fortalecer estos resultados se determinó una nueva concentración de MTA capaz de reducir un marcador inmunológico como el porcentaje de células productoras de IFN- γ . Se evaluó su efecto sobre PBMC de 3 individuos sanos y 3 pacientes con PET.

4.2.1 Determinación de la concentración de MTA

Se determinó una nueva concentración de MTA con el objetivo de evaluar su eficacia en la reducción del porcentaje de células productoras de IFN- γ en

células inducidas a inflamación, para posteriormente evaluarlo en pacientes con PET. Para esta nueva determinación se tomó en cuenta 3 parámetros: I) el número total de células, II) el porcentaje de viabilidad, y III) la concentración letal media, en tres periodos de tiempo (3, 6 y 24 horas).

Para el primer parámetro se observó que a las 3 horas ninguna concentración de MTA reduce significativamente el número de células en comparación de las células en ausencia de tratamiento (Figura 14). Por otro lado, tanto a las 6 horas como a las 24 horas, sí se observó una reducción en el número de células. En el caso de 6 horas este efecto se mostró a partir de la concentración 5000 μM (Figura 15), mientras que para 24 horas el efecto estuvo presente a partir de la concentración 2000 μM en adelante (Figura 16).

Respecto al segundo parámetro, se observó que a las 3 horas a partir de la concentración de 600 μM en adelante, existe una reducción del porcentaje de viabilidad (Figura 14). Sin embargo, este comportamiento no se refleja a las 6, donde recién a partir de 5000 μM hay una reducción significativa del porcentaje de viabilidad (Figura 15). Esto también se observó para las 24 horas a partir de 800 μM en adelante (Figura 16).

Finalmente, el tercer parámetro evaluado fue la concentración letal media (LC50). La LC50 se calculó para cada tiempo evaluado, donde el tiempo de tratamiento con MTA a las 3 horas posee la mayor LC50 con 5472 μM ; en segundo lugar, el tiempo de tratamiento a las 6 horas, cuyo LC50 es de 4347 μM ; y para las 24 horas de tratamiento fue de 1879 μM (Figura 17). Para los ensayos posteriores se utilizó la concentración de 500 μM de MTA.

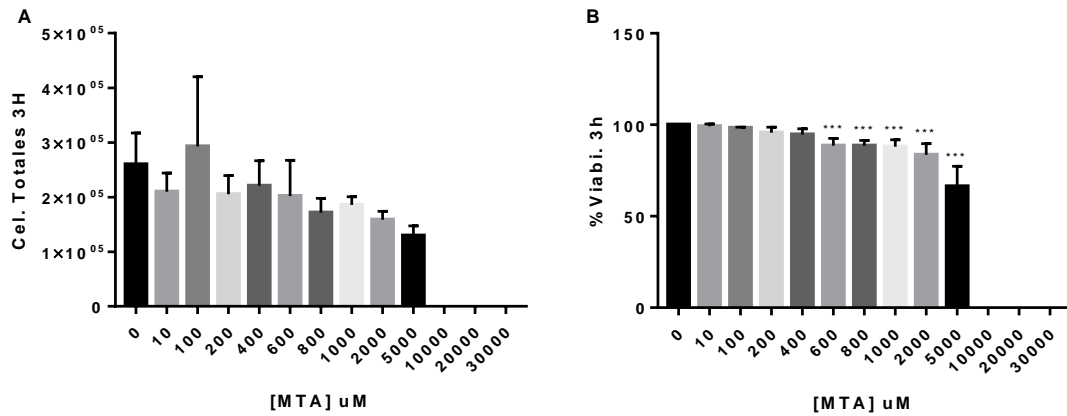


Figura 14. Parámetros celulares postratamiento MTA 3 horas. A) Número total de células. B) Porcentaje de viabilidad. Las concentraciones de 10 000 en adelante presentan un $p < 0.0001$. Se trato PBMC de individuos sanos con MTA por 3 horas a las concentraciones indicadas. El ensayo se realizó con 2 individuos sanos, con 3 réplicas técnicas por individuo. ***, $p < 0.001$.

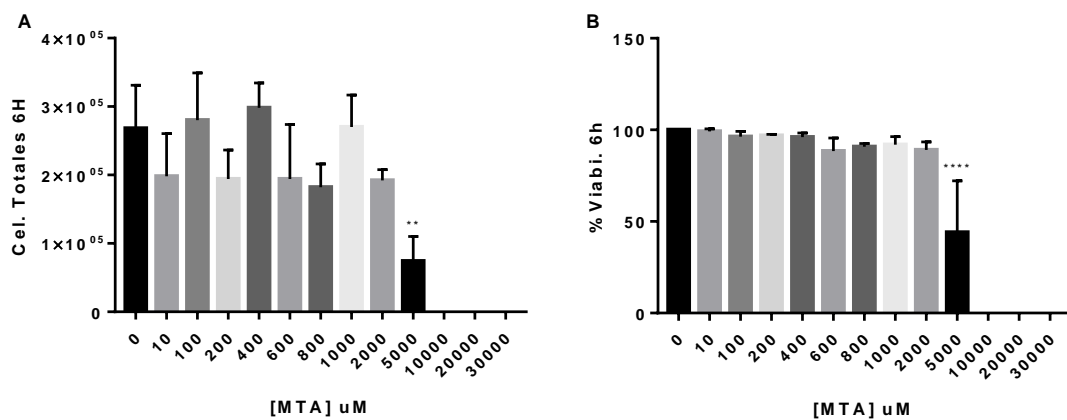


Figura 15. Parámetros celulares postratamiento MTA 6 horas. A) Número total de células. B) Porcentaje de viabilidad. Las concentraciones de 5000 en adelante para ambos parámetros presentan un $p < 0.0001$. Se trato PBMC de individuos sanos con MTA por 6 horas a las concentraciones indicadas. El ensayo se realizó con 2 individuos sanos, con 3 réplicas técnicas por individuo. **, $p = 0.0016$; ****, $p < 0.0001$.

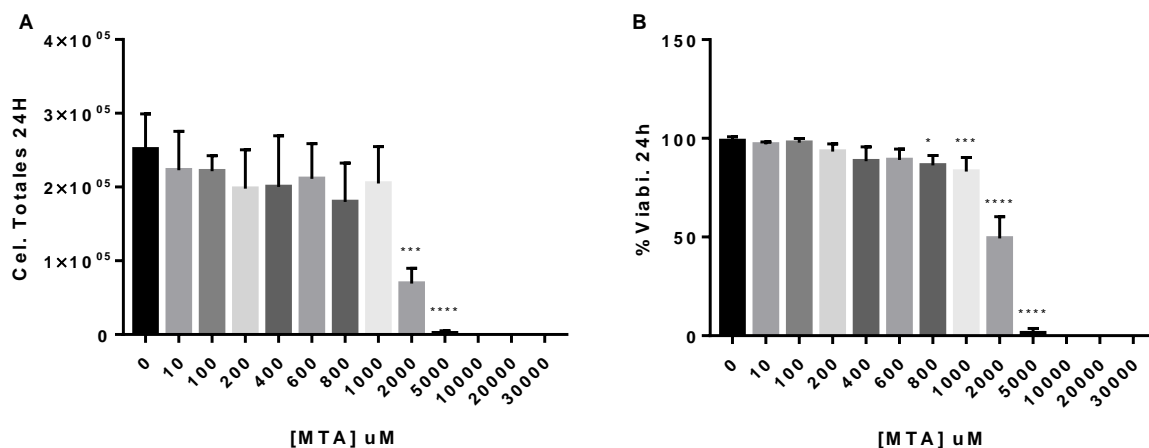


Figura 16. Parámetros celulares postratamiento 24 horas. A) Número total de células. B) Porcentaje de viabilidad. Las concentraciones de 5000 en adelante para ambos parámetros presentan un $p < 0.0001$. Se trato PBMC de individuos sanos con MTA por 24 horas a las concentraciones indicadas. El ensayo se realizó con 2 individuos sanos, con 3 réplicas técnicas por individuo. *, $p = 0.01$; ***, $p = 0.0001$; ****, $p < 0.0001$.

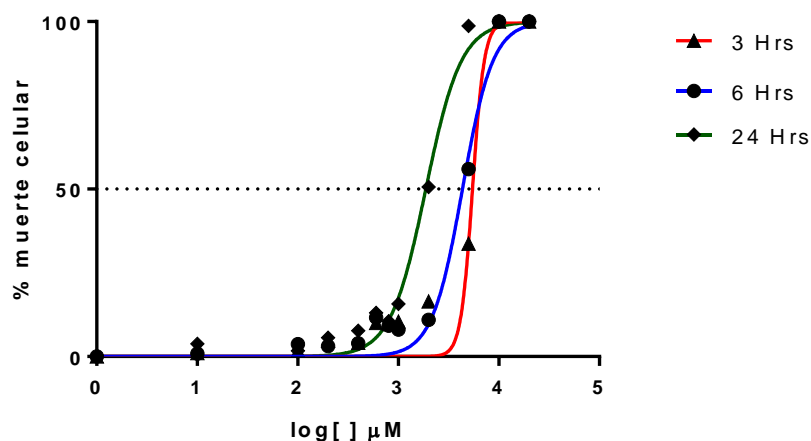


Figura 17. Concentración letal media de MTA sobre PBMC de individuos sanos. Las líneas representan la regresión no lineal que mejor se acomodó a los valores de muerte celular vs el logaritmo de la concentración de MTA para cada uno de los tiempos evaluados. La línea roja corresponde a las 3 horas ($LC = 5472 \mu M$), la línea azul a las 6 horas ($LC = 4347 \mu M$), y la línea verde a las 24 horas ($LC = 1879 \mu M$). Cada triangulo, punto o rombo, corresponde a la media de los valores de muerte celular de 2 individuos sanos.

4.2.2 Comprobación de la actividad antiinflamatoria de MTA

Para comprobar el efecto antiinflamatorio de MTA, se estimuló PBMC de individuos sanos con PMA más Ionomicina (P+I), se contabilizó la presencia de células CD45+ y células CD45+ CD4+ productoras de IFN- γ en presencia y ausencia de 500 μM de MTA en 2 tiempos: a las 3 y 6 horas. Se observó que en la subpoblación celular CD45+, las células inducidas con P+I mostraron

aproximadamente 20 veces más IFN- γ en comparación con células no inducidas (Figura 18B y 20A).

A su vez, se observó que a las 6 horas postratamiento con MTA el porcentaje de células productoras de IFN- γ se redujo alrededor de 5 veces en comparación con las células inducidas con P+I (Figura 19A). Esta disminución estadísticamente significativa indica un impacto de MTA sobre la reducción del efecto inflamatorio causado por P+I en estas células.

De igual forma la subpoblación CD45⁺ CD4⁺ o linfocitos T CD4, mostró mayores niveles de IFN- γ postinducción con P+I en comparación con las células no inducidas. Adicionalmente, se observó tanto a las 3 horas como a las 6 horas postratamiento con MTA una reducción en el porcentaje de células productoras de IFN- γ de aproximadamente 3.6 y 3.7 veces, respectivamente (Figura 18C y 20B).

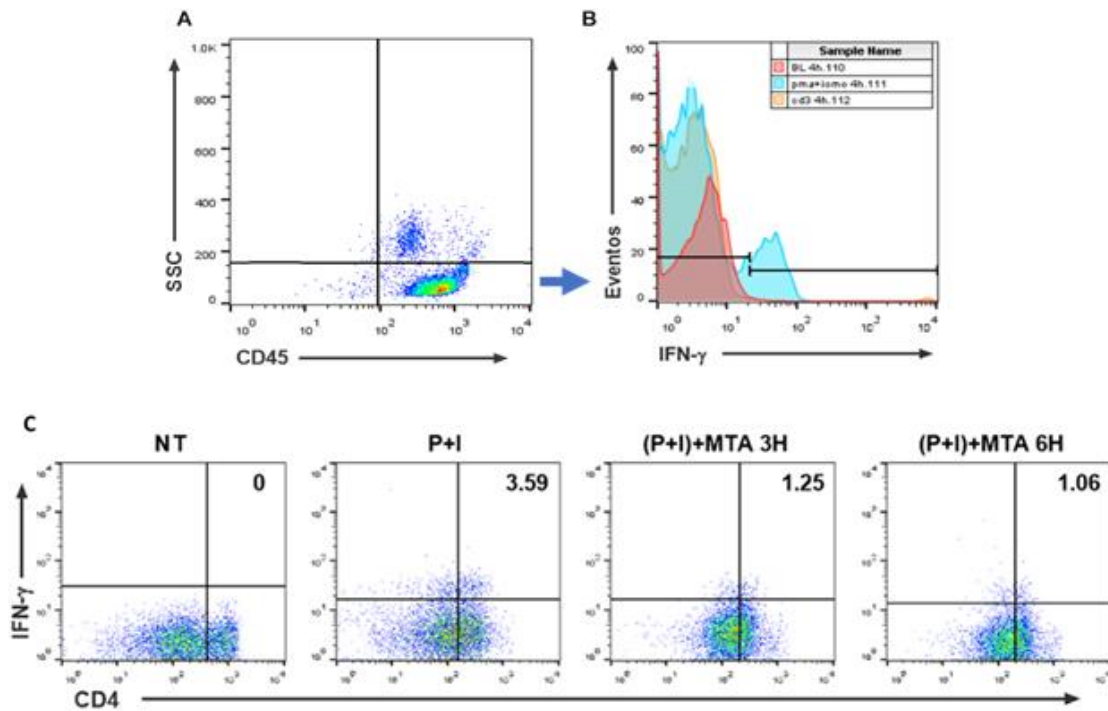


Figura 18. IFN- γ intracelular en PBMC de individuos sanos. Se cultivó PBMC con P+I por 4 horas y se midió IFN- γ intracelular. A) Histograma scatter vs CD45. B) Histograma eventos vs IFN- γ . Rojo, células sin tratamiento; Celeste, células inducidas con P+I; y Anaranjado, células inducidas con anti-CD3. Se utilizó anti-CD3 como un control de baja inducción. C) Histogramas IFN- γ vs CD4. Postinducción con P+I se trató los PBMC con MTA por 3 y 6 horas. Los números en negro representan el porcentaje de IFN- γ en células T CD4⁺. NT, Sin tratamiento; P+I, PMA más iodomicina; MTA, metiltioadenosina. Se muestra los resultados de un individuo sano, en total se analizaron 3 individuos.

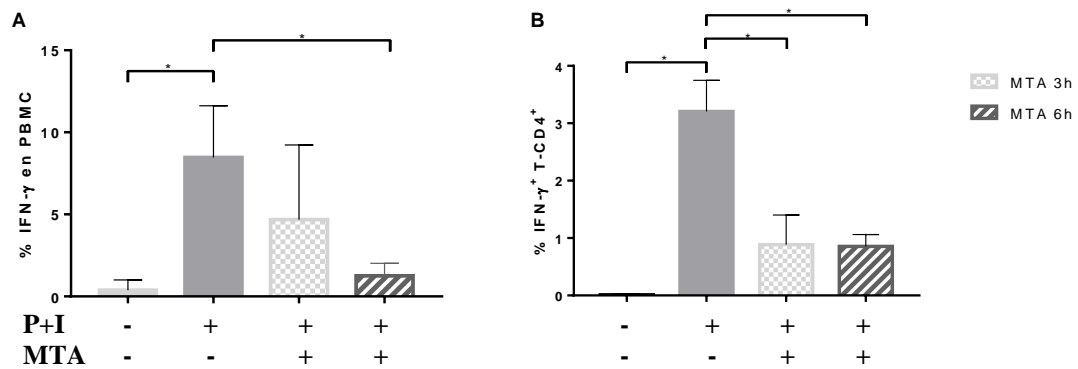


Figura 19. IFN- γ intracelular postratamiento con MTA en individuos sanos. Se cultivó PBMC con P+I por 4 horas, seguidamente se trató con MTA por 3 y 6 horas y se midió IFN- γ intracelular. A) Porcentaje de IFN- γ en PBMC CD45⁺. Media: Sin P+I ni MTA, 0.38; Con P+I sin MTA, 8.46; Con P+I y MTA 3h, 4.68, y Con P+I y MTA 6h, 1.25. B) Porcentaje de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺. Media: Sin P+I ni MTA, 0.01; Con P+I sin MTA, 3.2; Con P+I y MTA 3h, 0.88, y Con P+I y MTA 6h, 0.85. P+I, PMA más Ionomicina; MTA, metiltioadenosina; * $p < 0.05$. Se analizó 3 individuos sanos.

4.2.3 MTA disminuye el porcentaje de células productoras de IFN- γ en PBMC de pacientes con PET

Una vez comprobado el efecto antiinflamatorio de MTA en individuos sanos, se procedió a evaluarlo en pacientes con PET. En primer lugar, se observó que los pacientes con PET sin tratamiento presentaron hasta 6 veces más células productoras de IFN- γ en comparación con individuos sanos tanto para células CD45+ ($p=0.002$) y linfocitos T CD4+ ($p=0.003$) (Figura 20A y 21).

Por otro lado, se observó no solo una reducción de células productoras de IFN- γ postratamiento con MTA ($p=0.02$), sino también, postratamiento con PDTC ($p=0.006$) en células CD45+ (Figura 21A). Para el caso de PDTC se observó adicionalmente una reducción de células productoras de IFN- γ en linfocitos T CD4+ ($p=0.04$) (Figura 20B y 21B).

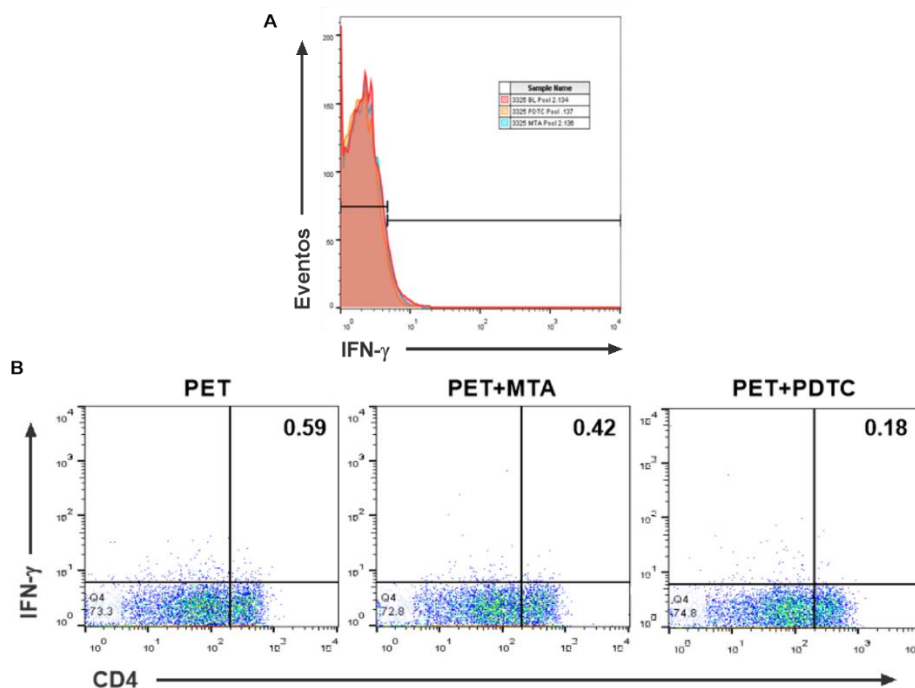


Figura 20. IFN- γ intracelular en PBMC de pacientes con PET. Se cultivó PBMC con MTA por 6 horas y se midió IFN- γ intracelular. A) Histograma eventos vs IFN- γ . Rojo, células sin tratamiento; Celeste, células con tratamiento de MTA (500 μ M); y Anaranjado, células tratadas con PDTC (10 μ M) B) Histogramas IFN- γ vs CD4. Se trató con MTA por 6 horas. Los números en negro representan el porcentaje de IFN- γ en células T CD4+. PET, Sin tratamiento; MTA, metiltioadenosina; y PDTC, pirrolidina ditiocarbamato. Se muestra los resultados de un paciente con PET, en total se analizaron 3 pacientes.

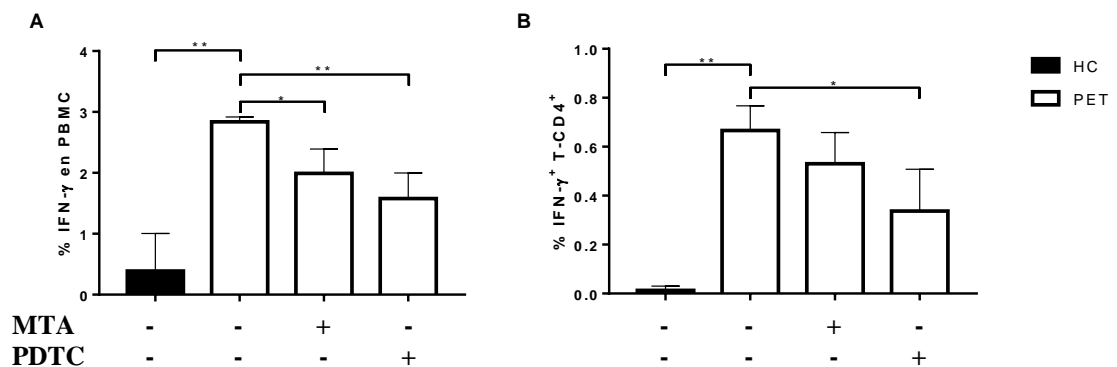


Figura 21. IFN- γ intracelular postratamiento con MTA en pacientes con PET. Se cultivó PBMC con MTA por 6 horas y se midió IFN- γ intracelular. A) Porcentaje de IFN- γ en PBMC CD45+. Media: HC sin MTA ni PDTC, 0.38; PET sin MTA ni PDTC, 2.84; PET con MTA sin PDTC, 1.99; y PET con MTA con PDTC, 1.57. B) Porcentaje de IFN- γ en linfocitos T CD4+. Media: HC sin MTA ni PDTC, 0.01; PET sin MTA ni PDTC, 0.66; PET con MTA sin PDTC, 0.53; y PET con MTA con PDTC, 0.33. HC, individuo sano; PET, paciente con PET; MTA, metiltioadenosina; y PDTC, pirrolidina ditiocarbamato. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Se analizó 3 pacientes con PET.

4.2.4 500 μ M de MTA no disminuye significativamente la actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET

Se cuantificó la actividad de la vía de NF- κ B de 2 individuos sanos sin tratamiento e inducidos a inflamación con P+I y tratados o no con MTA por 6 horas. A su vez, se midió la actividad en pacientes con PET bajo el mismo esquema. Se observó que los individuos sanos estimulados con P+I, mostraron niveles significativamente mayores de activación de la vía de NF- κ B en comparación con células no estimuladas ($p=0.005$). Sin embargo, postratamiento con MTA no se observó una reducción significativa (Figura 22A).

Por otro lado, se observó que los 3 pacientes disminuyen sus niveles de actividad de la vía de NF- κ B postratamiento con MTA (Figura 22B). Este resultado concordó con lo observado en la Fase I, donde 10 μ M de MTA redujo la actividad de la vía (Figura 11A). De manera similar se observó para PDTC, donde los niveles de actividad de la vía NF- κ B disminuyeron en ambas Fases. Sin

embargo, tanto para el tratamiento con 500 μ M de MTA y 10 μ M de PDTC no se observó una reducción significativa postratamiento.

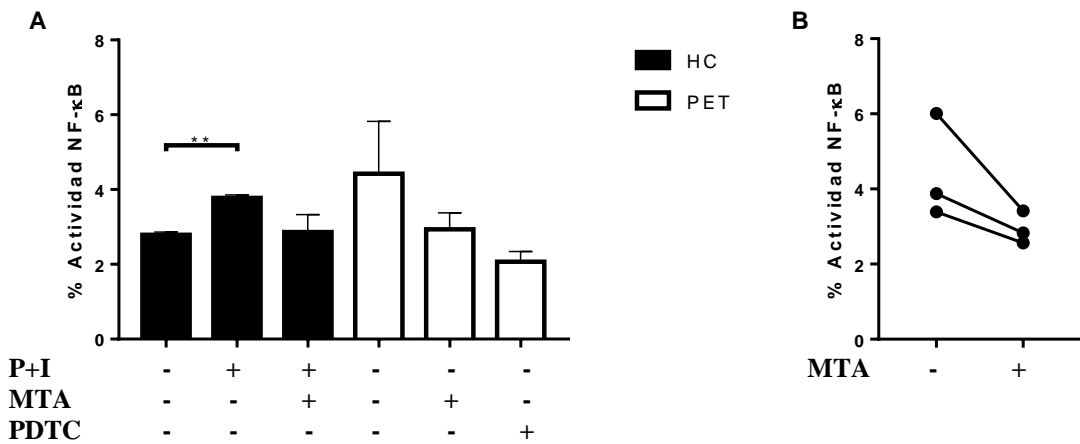


Figura 22. Actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET. Se cultivó PBMC con MTA o PDTC por 6 horas y se midió la actividad de la vía. A) Actividad de la vía de NF- κ B. B) Actividad de la vía de NF- κ B individual por paciente. Para la medición se utilizó extracto nuclear de PBMC, tanto de individuos sanos (n=2) como de pacientes con PET (n=3), tratados y no tratados con MTA (500 μ M) o PDTC (10 μ M). HC, individuos sanos; PET, paraparesia espástica tropical; MTA, metiltioadenosina; PDTC, pirrolidina ditiocarbamato. **p=0.005.

Por último, se presenta una tabla que muestra de manera resumida los resultados encontrados en la Fase I y II del presente estudio. La cual, podría ser de ayuda para su análisis y discusión en la siguiente sección del documento.

Tabla 4. Resumen de los resultados de la Fase I y II.

	Fase I	Fase II
Concentración de MTA y tiempo de tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> • 10 μM • 24 horas 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 μM • 6 horas
Actividad de NF- κ B	<ul style="list-style-type: none"> • Los pacientes con PET presentan mayor actividad de la vía en comparación con los individuos sanos • Los pacientes con PET muestran de manera basal y en presencia de MTA una actividad variable de la vía de NF-κB. • 10 μM de MTA disminuye la actividad de NF-κB en pacientes con PET • 10 μM PDTC disminuye la actividad de la vía de NF-κB 	<ul style="list-style-type: none"> • Células de individuos sanos inducidos a inflamación presentan mayor actividad de la vía de NF-κB en comparación con no inducidas • Los pacientes con PET presentan mayor actividad de la vía en comparación con los individuos sanos • 500 μM de MTA no disminuye la actividad de NF-κB en pacientes con PET* • 10 μM PDTC no disminuye la actividad de la vía de NF-κB*
Calidad de ARN	<ul style="list-style-type: none"> • El ARN cumplió con los controles de calidad establecidos por el fabricante 	ND
Ensayo de expresión	<ul style="list-style-type: none"> • No se encontró una reducción en la expresión relativa de genes regulados por NF-κB 	ND

Contribución de ADN genómico	<ul style="list-style-type: none"> La contribución del ADN genómico a la expresión de los genes es mínima 	ND
Cuantificación de citoquinas	<ul style="list-style-type: none"> Postratamiento con MTA no se encontró una disminución en los niveles de citoquinas proinflamatorias secretadas 	ND
Actividad antiinflamatoria de MTA	ND	<ul style="list-style-type: none"> MTA (500 μM) redujo la respuesta Th1 a las 3 horas de tratamiento MTA redujo tanto la respuesta Th1 como el porcentaje de células CD45+ productoras de IFN-γ a las 6 horas de tratamiento
Porcentaje de células productoras de IFN- γ	ND	<ul style="list-style-type: none"> 500 μM de MTA reduce significativamente el porcentaje de células CD45+ productoras de IFN-γ en pacientes con PET 10 μM de PDTC disminuye el porcentaje de células CD45+ productoras de IFN-γ, y la respuesta Th1 en pacientes con PET

La tabla presenta los resultados más relevantes del estudio. Para una lista completa revisar la sección de resultados. PET, Paraparesia espástica tropical; MTA, metiltioadenosina; PDTC, pirrolidina ditiocarbamato; Th1, células CD4 productoras de IFN- γ ; ND, no determinado. *Número de muestras pequeño (n=3) impediría observar diferencias significativas.

V. Discusión

HTLV-1 es un retrovirus prevalente en nuestro país donde se estima que entre 300 000 y 450 000 personas se encuentran infectadas. Se desconoce por qué una persona infectada por este virus puede permanecer asintomática toda su vida o desarrollar alguna enfermedad asociada. Solo el 10% de las personas infectadas desarrollan algún tipo de complicación, ya sea enfermedades asociadas como la Paraparesia Espástica Tropical (PET) o alguna infección como tuberculosis o estrongiloidiasis. Esto genera un problema de salud pública debido a que las personas asintomáticas en su mayoría desconoce ser portador del virus, generando una expansión silenciosa de la infección aunado a la falta de un tratamiento estandarizado capaz de combatir la infección viral (71).

En el caso de PET, los tratamientos están enfocados principalmente a aminorar los síntomas presentes y mejorar la calidad de vida del paciente, pero no a combatir la enfermedad *per se*. En este contexto, existe una búsqueda constante para conocer los mecanismos de la patogénesis y comprender los factores que se asocian a la presencia de la enfermedad y buscar opciones que permitan combatir la enfermedad que causa este virus.

Se ha evidenciado en diferentes países endémicos para la infección por HTLV-1, como Brasil y Japón, que los pacientes con PET presentan una mayor carga proviral en comparación con los pacientes asintomáticos, este hallazgo es consistente con las investigaciones previas realizadas por la Unidad de Virología del IMTA_vH-UPCH (72–75). Si bien la carga proviral es el factor probablemente más importante asociado a la presencia de PET, es posible encontrar pacientes con PET con baja carga proviral y del otro lado, pacientes asintomáticos con alta carga proviral (73).

Respecto a otros factores virales, no se han encontrado diferencias consistentes en la secuencia de ADN viral entre pacientes con PET e individuos asintomáticos infectados con HTLV-1. Resultados similares han sido descritos en pacientes peruanos (76). Por ello, en la cohorte de pacientes con HTLV-1 del IMTAvH se realizó una búsqueda de factores genéticos del hospedero asociados a PET con el objetivo de comprender la presencia de la enfermedad. En este estudio se analizó polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en 45 genes implicados en la respuesta del sistema inmunitario, la vía de NF- κ B, entre otros. Se encontró 2 genes (NKG2D y NFKBIA) asociados a la presencia de la enfermedad (20).

En el caso del gen NFKBIA se encontró tres SNP ubicados en la zona del promotor, que mostraron asociación con la presencia de PET (20). Posteriormente, se ha delimitado la región *upstream* del gen NFKBIA asociada con la presencia de PET (77). La ubicación de estos SNP en el promotor sugería que estos polimorfismos podrían estar implicados en la expresión de este gen; en este contexto, se analizó su expresión en pacientes con PET e individuos asintomáticos, encontrando que los pacientes con PET presentan menores niveles de ARNm del gen NFKBIA en comparación con los individuos asintomáticos (21).

Ambos hallazgos sugieren que la participación del gen NFKBIA podría contribuir con la presencia de PET en pacientes infectados con HTLV-1. Este gen, cuyo producto es la proteína I κ B α , forma parte de la vía de NF- κ B al secuestrar al factor de transcripción en el citoplasma e impedir su translocación al núcleo (19). La translocación de este factor de transcripción hacia el núcleo conlleva a la expresión de citoquinas proinflamatorias. Los resultados encontrados por nuestro grupo llevan a hipotetizar que los pacientes con PET presentan menos proteína I κ B α que los asintomáticos, lo cual haría que se secuestre

menos al factor de transcripción en el citoplasma y, por lo tanto, permite que este se transloque más hacia el núcleo incrementando su actividad y, por ende, la expresión de citoquinas proinflamatorias. Bajo esta hipótesis, el utilizar agentes moduladores de la vía NF- κ B como la metiltioadenosina (MTA) podría tener un impacto sobre la producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias que se ha observado en individuos que presentan PET.

El efecto antiinflamatorio de MTA se ha observado tanto en ensayos *in vitro*, células primarias o líneas celulares, como en modelos animales de neuro-inflamación, de enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y de desarrollo tumoral. Estos estudios muestran que MTA reduce los niveles de IFN- γ y otros marcadores inflamatorios, así como regula negativamente la actividad de la vía de NF- κ B (25,62,63,78).

Los mecanismos precisos por los cuales MTA genera un efecto antiinflamatorio son desconocidos; sin embargo, se cree que podría ser a través de la disminución de I) la interacción del factor de transcripción NF- κ B con su secuencia blanco (60), II) los niveles de I κ B α fosforilado (25), y III) los niveles de Akt fosforilado (24). Por ello, el presente estudio buscó en una primera fase comparar el efecto antiinflamatorio de MTA sobre células de pacientes con PET, para lo cual se evaluó la actividad de la vía de NF- κ B, expresión de ARNm y expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias. Se usó muestras de individuos sanos como control negativo de infección.

Con el propósito de fortalecer y consolidar los resultados obtenidos por estas tres aproximaciones (Fase I), se planteó una segunda fase de la investigación, en la cual se evaluó el efecto antiinflamatorio de MTA sobre células de individuos sanos inducidas a inflamación, y en nuevas muestras de pacientes con PET, por medio de la comparación

del porcentaje de células productoras de IFN- γ y la actividad de la vía de NF- κ B en presencia y ausencia de MTA. De igual forma que en la Fase I, se utilizó muestras de individuos sanos como control negativo de la infección.

5.1 Fase I: Evaluación del efecto de MTA

5.1.1 Determinación de la concentración de MTA

En esta fase se determinó que 10 μ M de MTA era la concentración que afectaba en menor grado a las células de individuos sanos. Esta concentración de MTA mostró solo una reducción del número total de células del 9% a diferencia de 26% para 200 μ M. Se han reportado estudios donde concentraciones superiores a 500 μ M no han mostrado efectos adversos sobre las células (63,79–81). Sin embargo, estos estudios evaluaron efectos macro como: supervivencia de ratones o disminución de la fibrogénesis inducida, así como, la no aparición de efectos adversos en humanos, mas no una evaluación del efecto sobre las células en cultivo.

Respecto a las investigaciones donde MTA muestra un efecto antiinflamatorio o inhibitorio, estas utilizan aproximaciones directas como medir la disminución de la proteína que secuestra al factor de transcripción NF- κ B o la reducción de caspasa 3 (25,62,78). A diferencia de estas investigaciones, la aproximación utilizada para determinar la concentración de MTA (número total de células y porcentaje de viabilidad) en este estudio, no permitió evaluar de manera directa el efecto antinflamatorio sobre la vía de NF- κ B. Sin embargo, la aproximación utilizada brindó un patrón general de cómo se comportaba la célula frente al compuesto, ya sea reduciendo la proliferación o viabilidad celular.

Los estudios previos muestran tiempos de tratamiento entre 2 a 6 horas, a diferencia del presente estudio que utilizó un tiempo de 24 horas. Esto debido a las

limitaciones para poder realizar una medición directa, por lo que, la aproximación utilizada requería de mayor tiempo de exposición al compuesto. Si bien la actividad de la vía de NF- κ B frente al estímulo sucede desde las 2 a 3 horas, es posible aún medirla a las 24 horas (82), más aún cuando los pacientes con PET presentan una actividad exacerbada de la vía, la cual está en constante activación por la presencia viral (83).

5.1.2 Impacto de 10 μ M MTA sobre la actividad de la vía NF- κ B en pacientes con PET

En primer lugar, los individuos sanos presentan no solo presentan una menor variabilidad en su actividad en comparación con pacientes con PET, sino también, alrededor de 30% menos de actividad de la vía de NF- κ B (Figura 11A y B). Ambos grupos fueron clínica y neurológicamente evaluados para descartar comorbilidades inflamatorias diferentes de PET. Por lo que, la actividad de los individuos sanos correspondería a una actividad basal (84), mientras que la actividad observada en los pacientes con PET se debería a la presencia de la infección por HTLV-1 (10).

La mayoría de pacientes con PET presentan una actividad mayor que los individuos sanos, la cual es comparable con la reportada en otros estudios (15,85); sin embargo, un paciente presenta un valor inferior (Figura 11A). Este comportamiento diferente podría ser atribuido a un error técnico o alguna condición no detectada durante su evaluación clínica. Dado que la cantidad de células utilizada fue la misma para todos los individuos y que las muestras fueron procesadas al mismo tiempo, es poco probable que el procesamiento de la muestra haya contribuido con lo observado.

Por otro lado, el paciente pudo haber presentado la coinfección con otro virus en el momento de la evaluación clínica. Por ejemplo, la proteína NS1 del virus de la Influenza previene la activación de la vía de NF- κ B (86). Sin embargo, el nivel observado

se esperaría tal vez para un individuo sano mas no para un paciente con PET, dado que estos pacientes ya presentan una activación exacerbada de la vía. Se sabe también que la proteína viral HBZ de HTLV-1 tiene la capacidad de disminuir la actividad de la vía de NF- κ B (87), pero esta proteína es más frecuente en pacientes con ATL (88,89). Si bien hay reportes de pacientes con PET que desarrollan ATL, la probabilidad es baja dado que solo hay alrededor de 9 casos (90,91). Debido a que no se sabe la razón por la cual el paciente se comporta de manera anómala respecto a los demás pacientes y no es objetivo del estudio determinar la causa de este comportamiento, se decidió excluir al paciente de los análisis estadísticos posteriores.

Al evaluar la actividad de la vía de NF- κ B en células de pacientes en presencia de tratamiento con 10 μ M de MTA, se observó que redujo la actividad de la vía respecto al grupo en ausencia de tratamiento (Figura 11B). Se ha observado que 100 μ M de MTA disminuye la cantidad I κ B α fosforilado en pacientes con esclerosis múltiple y 500 μ M reduce la cantidad de Akt fosforilado; en ambos casos esto conllevaría a una reducción de la vía de NF- κ B (24,25). Las variaciones de concentración de MTA y de tiempo de inducción entre los estudios han dificultado la identificación del mecanismo exacto por el cual MTA reduciría la actividad.

Por otro lado, el control de inhibición utilizado (10 μ M de PDTC) redujo de manera significativa la actividad de la vía de NF- κ B ($p < 0.05$) (Figura 11B). Este resultado concuerda con las concentraciones reportadas de PDTC (5 a 50 μ M) que presentan este efecto inhibitorio sobre la vía de NF- κ B (92–95).

5.1.3 Variabilidad en la actividad de la vía de NF- κ B

A pesar de que el tratamiento con MTA generó una reducción de la actividad de la vía NF- κ B, la respuesta de cada individuo varió no solo en presencia del tratamiento,

sino también en ausencia del mismo (Figura 11A). Estos hallazgos podrían deberse a factores como la criopreservación de los PBMC, el ingreso de MTA a la célula, la presencia viral (Abundancia de copias) y la susceptibilidad genética.

La variabilidad celular de los PBMC no se mostró afectada por el proceso del congelamiento, dado que la menor viabilidad celular observada en nuestro estudio fue de 90%, lo cual se encuentra dentro de lo esperado para los procedimientos utilizados (96–98), pero a nivel de expresión de ARN la congelación sí tiene un efecto negativo. Sin embargo, la activación de la vía no requiere de la expresión del factor de transcripción. Además, se ha reportado el uso de PBMC criopreservados de pacientes con PET para estudiar la actividad de la vía de NF- κ B en presencia de otros inhibidores (15). Adicionalmente, la criopreservación no afecta la diferenciación de monocitos a macrófagos o a células dendríticas, ni merma la capacidad de activación de la vía de NF- κ B en estas células (98). Por lo tanto, posiblemente la congelación de PBMC no sea un factor determinante en la variabilidad de la activación de NF- κ B observada, pero sí pueden estar contribuyendo a ella.

Otro posible factor sería el ingreso de MTA a la célula. Se conoce que existen alteraciones en los transportadores transmembrana que impiden el ingreso de medicamentos a la célula ocasionando fallas terapéuticas, por lo que existen tratamientos personalizados (99–102). Por ejemplo, se ha asociado un SNP en el gen *SLCO1B1*, transportador de aniones orgánicos, con una elevada concentración de nateglinida en plasma y una disminución de su eficacia en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (103). Sin embargo, para el caso de MTA no se tiene información sobre alteraciones en su transportador transmembrana que puedan afectar su ingreso. Cabe destacar que tampoco fue objetivo del estudio determinar la existencia de estas, por lo que no se pudo determinar su grado de contribución a la variabilidad observada en la vía de NF- κ B.

Una manera de medir la presencia viral es a través de la carga proviral (CPV), la cual, está dirigida al gen viral que codifica a la proteína Tax. Éste está estrechamente relacionado a la sobre activación de la vía de NF-κB en los pacientes con PET; por lo general una mayor CPV implicaría una mayor presencia de la proteína Tax y, por consiguiente, una mayor actividad de la vía NF-κB. El paciente con mayor actividad de NF-κB presentó una carga proviral promedio ($CPV=3 \times 10^3$), siendo la CPV más alta de 5×10^3 y la más baja de 400 aproximadamente (Datos no mostrados). Si bien existe la relación positiva entre la carga proviral y la expresión de ARNm, no necesariamente aquel que presente una mayor CPV tendría una mayor expresión de ARNm de Tax (104). Estas consideraciones sugieren que la carga proviral podría explicar, en cierta medida, la variabilidad en la actividad de la vía observada.

Respecto a la susceptibilidad genética del individuo frente a la infección y/o desarrollo de alguna enfermedad, en el caso de los pacientes con PET se ha reportado que SNP en la región promotora del gen NFKBIA (Inhibidor de la vía de NF-κB) está asociado con la presencia de la enfermedad (20). Esta asociación podría deberse a que se encontró que estos SNP están relacionados a una menor expresión del ARNm de este gen (105,106), lo que conllevaría una menor cantidad de proteína y, por lo tanto, una menor inhibición de la vía. A su vez, se ha reportado mutaciones y deleciones en el gen que codifica a la proteína A20 (TNFAIP3); esta proteína termina la activación de la vía por TNF. Estas variaciones en el gen reducen la expresión de su proteína y, por consiguiente, determinan una mayor activación de la vía NF-κB estimulada por TNF (107,108).

Por lo tanto, de los 4 factores que podrían estar explicando la variabilidad de la vía de NF-κB, principalmente la carga proviral como las variaciones genéticas tanto en el gen NFKBIA como TNFAIP3 y otras, explicarían en mayor medida el fenómeno observado. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de variaciones que puedan

alterar el ingreso de MTA a la célula y ocasionar la variabilidad de la vía observada en pacientes tratados.

5.1.4 Efecto del tratamiento con 10 μ M de MTA sobre la expresión de genes y citoquinas

Dado que la cantidad de ARN necesaria para el ensayo de superarray era elevada y el costo alto también se decidió realizar un *pool* de 4 muestras al azar para analizar la expresión de los genes. El agrupamiento de muestras conlleva a una pérdida de información referente a la variación de la expresión entre individuos (109). La ventaja de agrupar las muestras es determinar cómo responden los pacientes en conjunto al tratamiento con MTA. Dado que, el objetivo del estudio es evaluar el comportamiento de la expresión de los genes regulados por la vía (Anexo1), de existir una variación significativa en la expresión, sería necesario realizar una validación mediante un RT-qPCR, lo cual no estaba dentro del alcance del presente estudio.

Para los ensayos se siguieron las recomendaciones según la norma MIQUE (110) y se evaluó la temperatura de *melting*, la cual reveló la presencia de contaminación de ADN genómico (Anexo 2). Sin embargo, al presentar un Ct tardío, igual o mayor a 35 ciclos, correspondería a que se tiene aproximadamente 189 258.68 veces más ADNc que ADN genómico para el gen de interés en la muestra (Anexo 3). Por ello se concluyó que su contribución a la expresión era mínima.

No obstante, no se observó una reducción estadísticamente significativa en la expresión de genes postratamiento con MTA en muestra de pacientes con PET (Figura 12), pero la expresión relativa observada en estas muestras para genes de citoquinas como TNF e IFN correspondería a la observada para enfermedades inflamatorias en general como son asma, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, entre otras (111).

Por otro lado, solo 6 citoquinas lograron ser cuantificadas, pero no se observó una reducción en sus niveles en presencia de MTA tanto en conjunto (Figura 13) como de manera individual (Data no mostrada). Los niveles encontrados en este estudio (entre 30 a 1000pg/mL dependiendo de la citoquina) indicarían que los pacientes con PET presentan una exacerbada respuesta proinflamatoria, dado que dichos niveles son comparables con otros enfermedades inflamatorias, como asma y esclerosis múltiple, o enfermedades virales, donde se observa valores por encima de los 50 a 100 pg/mL para estas citoquinas (112–114).

Posiblemente no se observó un efecto de 10 μ M de MTA sobre la expresión de genes y los niveles de citoquinas, debido a dos condiciones: I) la criopreservación de los PBMC o II) la activación de otros factores de transcripción. Se ha reportado que, para los ensayos de expresión tanto de ARN como de citoquinas, la congelación de PBMC genera un cambio en los perfiles de expresión en comparación de muestras frescas.

La congelación de PBMC afecta la expresión de ARN y citoquinas cambiando el perfil de expresión en comparación con células frescas (115–117). En otras palabras, se ha observado que hay más IFN- γ secretada en células criopreservadas que en células frescas. Sin embargo, este efecto generado por la congelación de PBMC afectaría por igual a la células tratadas y no tratadas.

Por otro lado, la vía de NF- κ B es una de las principales vías de respuesta del sistema inmunológico en la producción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, otros factores de transcripción como NFAT también participan en la expresión de citoquinas (118). Al igual que NF- κ B, NFAT puede ser activada por Tax (119) y, por consiguiente, contribuir en la expresión de citoquinas proinflamatorias observadas. Por

lo tanto, probablemente los niveles encontrados representan la activación de otro factor de transcripción que, en cierta medida, suple la actividad de la vía de NF- κ B.

5.1.5 Conclusiones Fase I

En resumen, se encontró una fuerte variación en la actividad de la vía de NF- κ B en ausencia de tratamiento, la cual posiblemente estaría relacionada a las variaciones genéticas de cada individuo y la presencia viral. Sin embargo, no se pueden descartar los otros factores como el efecto de la congelación y el ingreso de MTA a la célula.

Por otro lado, el tratamiento con 10 μ M de MTA reduce la actividad de la vía de NF- κ B. Sin embargo, esta disminución de la actividad de la vía no tuvo un efecto aparente sobre la expresión de genes y citoquinas. Posiblemente se requiera una mayor concentración de MTA para poder reducir los efectos de otros factores de transcripción.

5.2 Fase II: Reevaluación de la concentración de MTA y su efecto sobre células inducidas a inflamación y PBMC de pacientes con PET

5.2.1 Determinación de la concentración efectiva de MTA

Para determinar la nueva concentración a utilizar, así como el tiempo de cultivo, se tomó como referencia los ensayos realizados en esclerosis múltiple, así como, en hepatocitos de ratón y células tumorales. En estos estudios la concentración de MTA fue superior a 10 μ M y se encontró una reducción en los marcadores inmunológicos evaluados (25,60–63).

Los resultados muestran que tanto a las 3 como 6 y 24 horas existe un efecto dosis respuesta tanto para el número total de células como para la viabilidad celular (Figura 14, 15 y 16), donde estos parámetros disminuyen mientras la concentración de MTA aumenta. A las 24 horas, la concentración de MTA que disminuye de manera significativa

la viabilidad celular y el número de células está a partir 800 y 2000 μM respectivamente (Figura 16). Por lo que, la determinación de la concentración de MTA utilizada en la Fase I mostró el inicio de este efecto concentración respuesta, pero la concentración seleccionada no tuvo el efecto modulador esperado.

Se observa también que, de 3 a 24 horas de tratamiento, la concentración de MTA que tiene un efecto sobre las células de individuos sanos se va reduciendo. Esto se evidencia claramente en el LD50 para cada uno de los ensayos (Figura 17), implicando que un mayor tiempo de tratamiento necesitará una menor concentración para ejercer un efecto similar. No obstante, para comprender mejor el comportamiento de MTA es necesario realizar estudios de farmacocinética y farmacodinámica.

Estos hallazgos nos permiten determinar que la concentración máxima de MTA que no produce un efecto adverso a células de individuos sanos, tanto a las 3 como a las 6 horas, sería de 500 μM . Además, esta concentración es una de las más altas reportadas en otros estudios (62,63,79,80,120,121).

5.2.2 Actividad antiinflamatoria de MTA y tiempo de tratamiento

Para medir la actividad antiinflamatoria de 500 μM de MTA se indujo primero inflamación en células de individuos sanos (Figura 18B y 19A), mediante el empleo de PMA más Ionomicina, compuestos que han mostrado activar la vía de NF- κ B en el mismo tiempo de inducción empleado en este estudio (122).

El tratamiento con 500 μM MTA en células sanas inducidas a inflamación mostró que solo a las 6 horas hay una reducción significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de células que producen IFN- γ entre los leucocitos en general, y en la respuesta Th1 (linfocitos T CD4+ IFN- γ). Mientras que, a las 3 horas, solo se observa una disminución en la respuesta

Th1 (Figura 19). En consecuencia, para asegurar el efecto de MTA sobre las células de pacientes con PET, se seleccionó un tiempo de tratamiento de 6 horas.

5.2.3 Efecto antiinflamatorio de MTA sobre células de pacientes con PET

En primer lugar, se observó que los pacientes con PET presentan hasta 7 veces más leucocitos productores de IFN- γ en comparación con los individuos sanos, y hasta 66 veces más en la respuesta Th1 (Figura 21). Esto confirma que los pacientes enrolados bajo los criterios de inclusión sí presentan una inflamación al momento de las evaluaciones.

La respuesta inflamatoria de los pacientes con PET es aproximadamente 2 veces menor que la observada para células sanas inducidas a inflamación. De igual forma se observa para la respuesta Th1. Sin embargo, esta diferencia se observa en diversos reportes, donde células de individuos sanos estimulados con PMA, PHA o LPS han mostrado niveles de IFN- γ entre 4 a 10%, dependiendo de la población celular evaluada, y los niveles de células productoras de IFN- γ en los pacientes con PET están entre 0.4 a 1% para linfocitos T CD4 (123–128). En ambos casos los valores reportados son comparables con los observados para células inducidas y pacientes con PET (Figura 19 y 20). Por consiguiente, la diferencia estaría en cómo se procesó la muestra de células o en el tipo de respuesta celular.

La principal diferencia en los estudios se encuentra a nivel del cultivo celular para la medición del porcentaje IFN- γ . En los individuos sanos, se utilizaron células recién extraídas, en tanto, para la medición en pacientes con PET, por lo general, las células son descongeladas luego de un periodo en nitrógeno líquido. No obstante, estudios donde se utilizó PBMC recién extraídos de pacientes con PET para medir porcentaje de células productoras de IFN- γ mediante la técnica de ELISPOT, mostraron valores menores o

similares a los encontrados por citometría (128,129). Por ello, la diferencia observada no sería necesariamente debido al descongelamiento de las células sino podría deberse a la respuesta frente al estímulo.

Al ser estimulados los PBMC de individuos sanos presentan una respuesta rápida a través de las células NK y las NKT, como parte de la respuesta innata (130), así como de la estimulación de los linfocitos TCD8 mediada por PMA (131). Estas células tienen la capacidad de expresar y liberar citoquinas de la familia de IFN (132–134). Por otro lado, la respuesta del sistema inmunitario en los pacientes con PET sería ya una respuesta adaptativa. Sin embargo, debido a la expresión de la proteína Tax, sigue existiendo una producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , considerado un importante marcador de la patogenicidad en PET (135,136).

Se observa una disminución significativa en el porcentaje de leucocitos productores de IFN- γ postratamiento con 500 μ M ($p < 0.05$) en células de pacientes con PET (Figura 21A). No obstante, la respuesta Th1 no muestra el mismo efecto (Figura 21B). Una posible explicación podría ser que el virus infecta preferentemente a los linfocitos T CD4+ (3). Por lo que, estas células estarían produciendo de manera exacerbada esta citoquina y, por consiguiente, contrarrestando el efecto antiinflamatorio de MTA.

Esto implicaría que 500 μ M de MTA sí tiene un efecto antiinflamatorio en los pacientes con PET, pero no a nivel de linfocitos T CD4+, sino a nivel de otras células CD45+ como las NK y linfocitos T CD8+. Sin embargo, existe una mayor frecuencia de linfocitos T CD8 en PBMC en comparación con células NK, por lo que el efecto observado estaría principalmente sobre la respuesta de los linfocitos T citotóxicos.

5.2.4 Impacto antiinflamatorio de 500 μ M de MTA sobre la vía de NF- κ B en células de pacientes con PET

De igual forma que en la Fase I se encontró que los pacientes con PET tuvieron una tendencia a mostrar mayores niveles de actividad de la vía NF- κ B en comparación con los individuos sanos. Sin embargo, solo las células inducidas con PMA más Isonomicina mostraron una activación de la vía significativamente mayor que la de las células sin inductor, 1.2 veces más aproximadamente (Figura 22A). Esto se debe posiblemente a que estas células muestran una respuesta rápida y homogénea al estímulo, a diferencia de los pacientes con PET donde la respuesta está definida por la interacción entre sistema inmunitario y la presencia viral y que ocasiona la alta variabilidad observada en la actividad de la vía (Figura 22B).

Se observó, que el tratamiento con 500 μ M de MTA no redujo la actividad de la vía de NF- κ B ($p > 0.05$). Posiblemente esto se deba al pequeño número de muestras incluidas para esta fase, dado que en la Fase I ($n=6$ pacientes, 10 μ M de MTA) sí se observa una reducción en la actividad de la vía. No obstante, al observar de manera individual la actividad de los pacientes, todos los pacientes evaluados disminuyen en diferente grado la actividad de la vía (Figura 22B). Esta variación en la actividad de la vía de NF- κ B, como se mencionó anteriormente, podría ser explicada por la susceptibilidad genética de cada individuo y su interacción con el virus.

Ninguno de los 3 pacientes evaluados en la Fase II en comparación con la Fase I mostró niveles de actividad de NF- κ B inferiores a los observados en los individuos sanos, ni mostró un incremento en su actividad postratamiento con 500 μ M de MTA (Figura 22B). Este resultado sugiere que posiblemente el MTA 10 μ M contribuyó en cierta medida al incremento de la actividad en uno de los pacientes de la Fase I. El MTA es un metabolito intermedio, el cual puede contribuir a la recuperación de

adeninas y metioninas en un evento de proliferación espontánea *in vitro*, que es frecuente en células de pacientes infectados con HTLV-1 (137–140); se podría pensar entonces que, al ser metabolizado por la célula durante la recuperación de adeninas y metioninas, habría menos MTA disponible para regular negativamente la vía de NF- κ B. Sin embargo, otros pacientes con cargas provirales altas, comparables con la del paciente discordante, y presumiblemente con niveles similares de proliferación espontánea, no mostraron ese incremento de actividad en la vía. En consecuencia, todavía no se tiene una explicación convincente para el comportamiento notoriamente anómalo de la muestra del paciente en cuestión

Por otro lado, PDTC tampoco mostró una reducción significativa (Figura 22A) en comparación con lo observado en la Fase I (Figura 11B). Existieron 2 diferencias entre ambas Fases, la primera fue el tiempo de tratamiento (24h en Fase I; 6h en Fase II) y la segunda, el número de pacientes evaluados (7 pacientes Fase I; 3 pacientes Fase II). Concentraciones de PDTC entre 0.1 a 10 μ M han mostrado tener un efecto inhibitor sobre la vía de NF- κ B (141), pero a diferencia de las 6 horas de tratamiento utilizadas en la Fase II del presente estudio, los autores utilizaron un tiempo de 12 horas. Por otro lado, el *p-value* es de 0.056 (Data no mostrada) para la Fase II, mientras que, para la Fase I es de 0.03, por lo que posiblemente incrementando el tiempo de tratamiento, así como el N muestral, podría incrementar el valor de *p*.

Finalmente, se observa que los valores obtenidos de actividad de la vía de NF- κ B en la Fase II (Figura 22) son menores en comparación con los observados en la Fase I (Figura 11). Esto se debe a que la proteína blanco para la detección de la actividad de NF- κ B fue diferente. En la Fase II se utilizó anticuerpos específicos contra la proteína p50 debido a la falta de disponibilidad de anticuerpo contra p65, el cual fue utilizado en la Fase I. Sin embargo, estas proteínas forman el dímero RelA/p50 y cumplen la función de

factor de transcripción, pero su proporción en el núcleo no es la misma. Tanto RelA como p50 pueden formar dímeros, consigo mismo o con otras proteínas del grupo NF- κ B, los cuales, son capaces de unirse al ADN. Pero a diferencia de p50, RelA forma algunos dímeros que no tienen esta capacidad (142). Por lo tanto, existiría un mayor número de proteína p50 capaz de unirse al ADN en comparación con RelA y, por consiguiente, una mayor señal detectable en el ELISA. Esto conllevaría que al realizar la corrección por el extracto nuclear de Raji, los valores correspondientes a p50 sean menores que los observados para RelA. Esto concuerda con lo reportado por el fabricante.

5.2.5 Conclusiones Fase II

En resumen, la concentración de 500 μ M no mostró disminuir significativamente la actividad de NF- κ B en pacientes con PET. No obstante, sí se observó un efecto antiinflamatorio al emplear esta concentración de MTA, debido a que redujo de manera significativa el porcentaje de leucocitos productores de IFN- γ .

VI. Conclusiones

- La concentración de 10 μ M de MTA presentó el efecto reductor esperado en la actividad de NF- κ B, pero no sobre la expresión de genes ni citoquinas reguladas por este factor de transcripción.
- Existe una actividad heterogénea de la vía de NF- κ B en ausencia y presencia de MTA, la cual podría estar explicada por la susceptibilidad genética del hospedero y la interacción con el virus.
- La concentración de 500 μ M de MTA posee un efecto antiinflamatorio al modular la cantidad de células CD45+ productoras de IFN- γ en los pacientes con PET.

VII. Limitaciones y Recomendaciones

La aproximación metodológica utilizada (porcentaje de viabilidad y número total de células) para la determinación de la concentración de MTA óptima a emplear no fue la más adecuada. Ello no se pudo determinar de manera directa el efecto de MTA sobre la vía de NF- κ B en individuos sanos para luego ser extrapolado hacia los pacientes con PET.

Por otro lado, la criopreservación de células nos permitió ampliar el enrolamiento de pacientes para los ensayos realizados y así poder evaluar el efecto de MTA sobre la respuesta inflamatoria de los pacientes con PET. Sin embargo, a pesar de que para ciertos ensayos se puede trabajar con células descongeladas, aún queda la posibilidad que el proceso de congelar/descongelar pueda tener un impacto importante sobre las funciones celulares. Por ello, a manera de validar los hallazgos encontrados, sería recomendable evaluarlo sobre células frescas de pacientes con PET.

Es necesario un mayor número de muestras de pacientes con PET para afirmar con un mayor grado de certeza que MTA presenta un efecto modulador sobre la inflamación de los pacientes con PET. Esto debido a que se observó una actividad de la vía de NF- κ B heterogénea entre los pacientes con PET.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos sobre la actividad de la vía de NF- κ B en pacientes con PET, sería recomendable evaluar los genes descritos (Ej. NFKBIA) que pueden tener un impacto directo sobre la respuesta de la vía de NF- κ B en estos pacientes. Para ello el grupo ya logró determinar la región de este gen asociada a la presencia de PET, por lo que análisis funcionales de dicha región sobre la expresión de este gen reforzarían aún más los hallazgos del presente estudio.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front. Microbiol.* 2012;3:388. doi:10.3389/fmicb.2012.00388
2. Mónica D, Ch P. *Situación de la Epidemia de VIH en el Perú*. 2015 Available from: <https://www.minsa.gob.pe/Especial/2015/vih/matcom/Situacion-Epidemiologica-VIH-2015.pdf>
3. 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.
4. Bangham CRM. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2018;36(1):43-71.
5. Bangham CRM, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015;1:15012. doi:10.1038/nrdp.2015.12.
6. Proietti FA, Babara A, Carneiro-Proietti F, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005;24(39):6058-68
7. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima 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.
8. Lee R, Schwartz RA. Human T-lymphotropic virus type 1–associated infective dermatitis: A comprehensive review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;64(1):152–60.
9. Ita F, Mayer EF, Verdonck K, Gonzalez E, Clark D, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus type 1 infection is frequent in rural communities of the southern Andes of Peru. *Int. J. Infect. Dis.* 2014;19(1):46–52.
10. Bangham CRM, Ratner L. How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)? *Curr. Opin. Virol.* 2015;14:93–100. doi:10.1016/j.coviro.2015.09.004.
11. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, *et al.*

- Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am. J. Epidemiol.* 1991;133(11):1114–24.
12. Yamano Y, Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Front. Microbiol.* 2012;3:1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00389.
 13. Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N, *et al.* Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1998;17(2):167–70.
 14. Martin F, Fedina A, Youshya S, Taylor GP. A 15-year prospective longitudinal study of disease progression in patients with HTLV-1 associated myelopathy in the UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2010;81(12):1336–40.
 15. Oh U, McCormick MJ, Datta D, Turner R V., Bobb K, Monie DD, *et al.* Inhibition of immune activation by a novel nuclear factor-kappa B inhibitor in HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood.* 2011;117(12):3363–9.
 16. Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell. Res.* 2011;21(1):71–85.
 17. Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: Key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(2):72–9.
 18. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009;1(6):a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651.
 19. Chiao PJ, Miyamoto S, Verma IM. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91(1):28–32. doi:10.1073/pnas.91.1.28
 20. Talledo M, López G, Huyghe JR, Verdonck K, González E, Clark D, *et al.* Possible implication of NFKB1A and NKG2D genes in susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian patients infected with HTLV-1. *J. Med. Virol.* 2012;84(2):319–26. doi:10.1002/jmv.22255.
 21. Talledo M. Determinación de los perfiles de expresión de ARN mensajero de la vía de señalización NF-KB en pacientes con paraparesia espástica tropical y pacientes

- asintomáticos HTLV-1 positivos [Tesis maestría]. Lima, Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2014
22. Karin M (ed.). *NF- κ B in health and disease*. Berlin. Springer; 2011. 268p. doi:10.1007/978-3-642-16017-2
 23. Avila MA, García-Trevijano ER, Lu SC, Corrales FJ, Mato JM. Methylthioadenosine. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004;36(11):2125–30. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.016.
 24. Henrich FC, Singer K, Poller K, Bernhardt L, Strobl CD, Limm K, *et al.* Suppressive effects of tumor cell-derived 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine on human T cells. *Oncoinmunology*. 2016;5(8):e1184802. doi:10.1080/2162402X.2016.1184802.
 25. Moreno B, Hevia H, Santamaria M, Sepulcre J, Muñoz J, García-Trevijano ER, *et al.* Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. *Ann. Neurol.* 2006;60(3):323–34.
 26. Fujiyoshi T, Li H-C, Lou H, Yashiki S, Karino S, Zaninovic V, *et al.* Characteristic Distribution of HTLV Type I and HTLV Type II Carriers among Native Ethnic Groups in South America. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002;15(14):1235–9.
 27. Einsiedel LJ, Verdonck K, Gotuzzo E. Human T-Lymphotropic Virus 1: Clinical Aspects of a Neglected Infection among Indigenous Populations. In: Scheld WM, Grayson WL, Hughes JM. (eds.) *Emerging Infections 9*. Washington. American Society of Microbiology; 2010. p.109–27.
 28. Gotuzzo E, Arango C, de Queiroz-Campos A, Isturiz RE. Human T-Cell Lymphotropic Virus-I in Latin America. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2000;1(1):211–39.
 29. Sanchez-Palacios C, Gotuzzo E, Vandamme AM, Maldonado Y. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. *Int. J. Infect. Dis.* 2003;7(2):132–7.
 30. Larsen O, Andersson S, da Silva Z, Hedegaard K, Sandström A, Nauclicr A, *et al.* Prevalences of HTLV-1 infection and associated risk determinants in an urban population in Guinea-Bissau, West Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2000;25(2):157–63.
 31. Edlich RF, Arnette J a, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus

- type-I (HTLV-I). *J. Emerg. Med.* 2000;18(1):109–19.
32. Curren R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, *et al.* HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front. Microbiol.* 2012;3:406. doi:10.3389/fmicb.2012.00406.
 33. Furuta R, Yasunaga J, Miura M, Sugata K, Saito A, Akari H, *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. Ross SR (ed.). *PLOS Pathog.* 2017 Nov 29;13(11):e1006722. doi:10.1371/journal.ppat.1006722.
 34. 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.
 35. Pinon JD, Klasse PJ, Jassal SR, Welson S, Weber J, Brighty DW, *et al.* Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp46 Interacts with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Virol.* 2003;77(18):9922–30.
 36. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau J-M, Blot V, Janvier S, *et al.* Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* 2006;80(14):6844–54.
 37. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, *et al.* The Glucose Transporter Glut1 is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metab.* 2014;20(1):61–72.
 38. Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, *et al.* Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *J. Immunol.* 2008;180(7):4476-86.
 39. Jones KS, Petrow-sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into. *J. Virol.* 2005;79(20):12692–702.
 40. Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology.* 2010;7:99. doi:10.1186/1742-4690-7-99.
 41. Barnard AL, Igakura T, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CRM. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood.* 2005;106(3):988-95. doi:10.1182/blood-2004-07-2850.

42. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, *et al.* HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology*. 2014;11:172. doi:10.1186/1743-422X-11-172.
43. Moens B, Decanine D, Maria Menezes S, Khouri R, da Silva-Santos G, Lopez G, *et al.* Ascorbic Acid Has Superior Ex Vivo Antiproliferative, Cell Death-Inducing and Immunomodulatory Effects over IFN- α in HTLV-1-Associated Myelopathy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(7):e1729. doi:10.1371/journal.pntd.0001729.
44. Nejmeddine M, Bangham CRM. The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses*. 2010;2(7):1427–47. doi:10.3390/v2071427.
45. Niederer HA, Bangham CRM. Integration site and clonal expansion in human chronic retroviral infection and gene therapy. *Viruses*. 2014;6(11):4140–64. doi:10.3390/v6114140.
46. Fogarty KH, Zhang W, Grigsby IF, Johnson JL, Chen Y, Mueller JD, *et al.* New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and gag-gag interactions in living cells. *Viruses*. 2011;3(6):770–93. doi:10.3390/v3060770.
47. Nakano K, Watanabe T. Htlv-1 rex: The courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front. Microbiol.* 2012;3:330. doi:10.3389/fmicb.2012.00330.
48. Zhao T, Matsuoka M. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. *Front. Microbiol.* 2012;3:247. doi: 10.3389/fmicb.2012.00247.
49. Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:475–96. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.475.
50. Boxus M, Twizere J-C, Legros S, Dewulf J-F, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*. 2008;5:76. doi:10.1186/1742-4690-5-76.
51. Osame M. Review of WHO Kagoshima Meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W (ed). *Hum. Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press. 1990;191–7.
52. Castro-costa CMDE, Araújo AQC, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, Silva ELMDA, *et al.* Proposal for Diagnostic Criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-Associated Myelopathy (HAM/TSP). *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2006;22(10):931–5.

- doi:10.1089/aid.2006.22.931.
53. Kurtzke JF. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 1955;5(8):580-3.
 54. Kubota R. Pathogenesis of human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin. Exp. Neuroimmunol*. 2017;8:117–28. doi:10.1111/cen3.12395.
 55. Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NFκB Signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
 56. MacCann P, Pegg A, Sjoerdsma A (eds.) *Inhibition of Polyamine Metabolism*. Orlando: Academic press inc; 1987. p.40–41. doi:10.1016/B978-0-12-481835-4.X5001-7
 57. Pajula RL, Raina A. Methylthioadenosine, a potent inhibitor of spermine synthase from bovine brain. *FEBS Lett*. 1979;99(2):343–5. doi:10.1016/0014-5793(79)80988-6.
 58. Pajula RL. Kinetic properties of spermine synthase from bovine brain. *Biochem. J*. 1983;215(3):669–676. doi:10.1042/bj2150669.
 59. Pascale RM, Simile MM, Satta G, Seddaiu MA, Daino L, Pinna G, *et al*. Comparative effects of L-methionine, S-adenosyl-L-methionine and 5'-methylthioadenosine on the growth of preneoplastic lesions and DNA methylation in rat liver during the early stages of hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res*. 11(4):1617–24.
 60. Law RE, Stimmel JB, Damore MA, Carter C, Clarke S, Wall R. Lipopolysaccharide-Induced NF-KB Activation in Mouse 70Z/3 Pre-B Lymphocytes Is Inhibited by Mevinolin and 5'-Methylthioadenosine: Roles of Protein Isoprenylation and Carboxyl Methylation Reactions. *Mol. Cell Biol*. 1992;12(1)103-11 doi:10.1128/mcb.12.1.103.
 61. Ansorena E, García-Trevijano ER, Martínez-Chantar ML, Huang Z-Z, Chen L, Mato JM, *et al*. S-adenosylmethionine and methylthioadenosine are antiapoptotic in cultured rat hepatocytes but proapoptotic in human hepatoma cells. *Hepatology*. 2002;35(2):274–80. doi:10.1053/jhep.2002.30419.
 62. Moreno B, Lopez I, Fernández-Díez B, Gottlieb M, Matute C, Victoria Sá nchez-Gó mez M, *et al*. Differential Neuroprotective Effects of 5-Deoxy-5-Methylthioadenosine. *PLoS One*. 2014;9(3):e90671. doi:10.1371/journal.pone.0090671.

63. Hevia H, Varela-Rey M, Corrales FJ, Berasain C, Martínez-Chantar ML, Latasa MU, *et al.* 5'-methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2004;39(4):1088–98. doi:10.1002/hep.20154.
64. Vandebark AA, Ferro AJ, Barney CL. Inhibition of lymphocyte transformation by a naturally occurring metabolite: 5'-Methylthioadenosine. *Cell Immunol*. 1980;49(1):26–33. doi:10.1016/0008-8749(80)90052-0.
65. Wei C, Li J, Bumgarner RE. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics*. 2004;5:87. doi:10.1186/1471-2164-5-87.
66. World Health Organization, Regional Office for South-East Asia. *Guidelines on Establishment of Virology Laboratory in Developing Countries*. India. World Health Organization; 2009 Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205181>.
67. Government of Canada. *Biosafety Directive for Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), and Related Simian Retroviruses*. Available from: <https://www.canada.ca/en.html>.
68. Casey L, Wilson D (eds.). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health; 2009.
69. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8(2):R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
70. D'haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J. miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization. In: Fan JB. (eds.) *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Clifton, USA. 2012. p.261–72.
71. Oh U, Jacobson S. Treatment of HTLV-1 associated myelopathy/Tropical Spastic paraparesis: Towards Rational Targeted Therapy. *Neurol Clin*. 2009;26(3):781-x. doi:10.1016/j.ncl.2008.03.008
72. Best I, Adai V, Verdonck K, González E, Tipismana M, Clark D, *et al.* Proviral load and

- immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin. Exp. Immunol.* 2006;146(2):226–33. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03208.x
73. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, *et al.* Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J. Neurovirol.* 1998;4(6):586–93.
74. Olavarria VN, Do A, Gomes N, De Almeida Kruschewsky R, Galvão-Castro B, Fernanda M, *et al.* Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* 2012;16(4):357–60. doi:10.1016/j.bjid.2012.06.022.
75. Matsuura E, Nozuma S, Tashiro Y, Kubota R, Izumo S, Takashima H. HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): A comparative study to identify factors that influence disease progression. *J. Neurol. Sci.* 2016;371:112–6. doi:10.1016/j.jns.2016.10.030.
76. Talledo M, López G, Huyghe JR, Verdonck K, Adai V, González E, *et al.* Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *J. Med. Virol.* 2010;82(3):460–6. doi:10.1002/jmv.21675.
77. Posadas AE, Rosado JJ, Gotuzzo E, Talledo MJ. Delimitation of the upstream region of NFKBIA gene associated with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis using candidate Tag-SNPs in Peruvian HTLV-1 infected individuals. *Infect. Genet. Evol.* 2019;75:103929. doi:10.1016/j.meegid.2019.103929.
78. Andreu-Pérez P, Hernandez-Losa J, Moliné T, Gil R, Grueso J, Pujol A, *et al.* Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and in vivo tumor growth. *BMC Cancer.* 2010;10(1):265. doi:10.1186/1471-2407-10-265
79. Stramentinoli G, Gennari F. Adenosine derivatives of anti-inflammatory and analgesic activity, and therapeutic compositions which contain them as their active principle. Stramentinoli patent 454122. Filed Aug 6, 1982; Issued Jun 12, 1984.

80. Moratti EM. Pharmaceutical compositions containing 5'-deoxy-5'-methylthioadenosines adenosylmethionine and their salts for reducing seborrhea. Moratti patent 5753213. Filed Mar 13, 1990; Issued May 19, 1998.
81. Simile MM, Banni S, Angioni E, Carta G, De Miglio MR, Muroli MR, *et al.* 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. *J. Hepatol.* 2001;34(3):386–94. doi:10.1016/S0168-8278(00)00078-7.
82. Badr CE, Niers JM, Tjon-Kon-Fat L-A, Noske DP, Wurdinger T, Tannous BA. Real-time monitoring of nuclear factor kappaB activity in cultured cells and in animal models. *Mol. Imaging.* 2009;8(5):278–90.
83. Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kB by the Tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IκB kinases. *Oncogene.* 1999;18(49):6948-58. doi:10.1038/sj.onc.1203220.
84. Hupalowska A, Pyrzynska B, Miaczynska M. APPL1 regulates basal NF-kB activity by
85. Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga J-I, Toyokuni S, Matsuoka M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia.* 2004;18(8):1357–63. doi:10.1038/sj.leu.2403400.
86. Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, *et al.* Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappa B and induction of Alpha/Beta Interferon. *J. Virol.* 2000;74(24):11566-73.
87. Zhao T. The role of HBZ in HTLV-1-induced oncogenesis. *Viruses.* 2016;8(2):pii:E34. doi: 10.3390/v8020034.
88. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga JI, Saito K, Arimura K, *et al.* *In vivo* expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology.* 2009;6:19. doi: 10.1186/1742-4690-6-19.
89. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, *et al.* Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma

- antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology*. 2016;13(1):29. doi: 10.1186/s12977-016-0263-z.
90. Tamiya S, Matsuoka M, Takemoto S, Shimizu K, Yamaguchi K, Mita S, et al. Adult T cell leukemia following HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: case reports and implication to the natural course of ATL. *Leukemia*. 1999;9(10):1768–70.
 91. Nakaya Y, Yoshida M, Tsutsumi M, Fuseya H, Horiuchi M, Yoshimura T, et al. Hodgkin-like adult T-cell leukemia/lymphoma that developed during the follow-up of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Clin. Exp. Hematop.* 2019;59(3):130–4.
 92. Park H-H, Kim S-G, Kim MJ, Lee J, Choi B-K, Jin M-H, et al. Suppressive Effect of Tomentosin on the Production of Inflammatory Mediators in RAW264.7 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2014;37(7):1177-83. doi:10.1248/bpb.b14-00050.
 93. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Seherer D, Ballard D, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1995;9(13):1586-97. doi:10.1101/gad.9.13.1586.
 94. Smirnov AS, Ruzov AS, Budanov A V, Prokhortchouk A V, Ivanov A V, Prokhortchouk EB. High constitutive level of NF- κ B is crucial for viability of adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* 2001;8(6):621-30.
 95. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauerl SL, Arsura M, Katz D, et al. Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 1996;15(7):4662-90.
 96. Kleeberger CA, Lyles RH, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Giorgi J V. Viability and Recovery of Peripheral Blood Mononuclear Cells Cryopreserved for up to 12 Years in a Multicenter Study. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999;6(1):14–9.
 97. Aziz N, Margolick JB, Detels R, Rinaldo CR, Phair J, Jamieson BD, et al. Value of a quality assessment program in optimizing cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells in a multicenter study. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013;20(4):590–5. doi:10.1128/CVI.00693-12.
 98. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for

- pharmacopeial monocyte activation test. *J. Immunol. Methods*. 2014;405:181–91. doi:10.1016/j.jim.2014.01.005.
99. Ramirez M, Rajaram S, Steininger RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, *et al*. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat. Commun*. 2016;7(1):10690. doi:10.1038/ncomms10690.
100. Slev P. Host genomics and HCV personalized medicine. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 2012;42(4):363–9.
101. Verma M. Personalized medicine and cancer. *J. Pers. Med*. 2012;2(1):1–14. doi:10.3390/jpm2010001.
102. Stocco G, De Iudicibus S, Franca R, Addobbati R, Decorti G. Personalized therapies in pediatric inflammatory and autoimmune diseases. *Curr. Pharm. Des*. 2012;18(35):5766–75. doi:10.2174/138161212803530853.
103. Cheng Y, Wang G, Zhang W, Fan L, Chen Y, Zhou H-H. Effect of CYP2C9 and SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nateglinide in healthy Chinese male volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2013;69(3):407–13. doi:10.1007/s00228-012-1364-9.
104. Villaudy J, Wencker M, Gadot N, Gillet NA, Scoazec J-Y, Gazzolo L, *et al*. HTLV-1 propels thymic human T cell development in “Human Immune System” Rag2^{-/-} gamma c^{-/-} mice. Ross SR, ed. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002231. doi:10.1371/journal.ppat.1002231.
105. Ali S, Hirschfeld A, Victor R, Fortuno ES, Kollmann TR, Turvey SE. Functional characterization of human variants of NFKBIA: a key regulator of immune responsiveness implicated in susceptibility to infectious and inflammatory disease. *Allergy Asthma Clin. Immunol*. 2010;6(Suppl 3):P2. doi:10.1186/1710-1492-6-S3-P2.
106. Turvey R Kollmann SE, Daley D, Sandford AJ, Becker PM, Chan-Yeung M, W Hancock RE, *et al*. Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibillity to childhood asthma, bronchiolitis and bronchopulmonary dysplasia. *J. Immunol*. 2013;190(8):3949-58. doi:10.4049/jimmunol.1201015.

107. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula S V, Brahmachary M, Shen Q, *et al.* Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717–21. doi:10.1038/nature07968.
108. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*. 2000;289(5488):2350–4. doi:10.1126/science.289.5488.2350.
109. Peng X, Wood CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ. Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments microarray experiment. *BMC Bioinformatics*. 2003;4:26. doi:10.1186/1471-2105-4-26.
110. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem*. 2009;55(4):611-22 doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
111. Eter P, Arnes JB, Arin K. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. Med.* 1997;336(15):1066-71. doi:10.1056/NEJM199704103361506.
112. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF, Flauzino T, Lopes J, *et al.* Cytokine profile in patients with progressive Multiple Sclerosis and its association with disease progression and disability. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(4):2950–60. doi:10.1007/s12035-016-9846-x.
113. Schulte BM, Lanke KHW, Piganelli JD, Kers-Rebel ED, Bottino R, Trucco M, *et al.* Cytokine and chemokine production by human pancreatic islets upon Enterovirus infection. *Diabetes*. 2012;61(8):2030–6. doi:10.2337/db11-1547.
114. Pukelsheim K, Stoeger T, Kutschke D, Ganguly K, Wjst M. Cytokine profiles in asthma families depend on age and phenotype. *PLoS One*. 2010;5(12):e14299. doi:10.1371/journal.pone.0014299.
115. Yang J, Diaz N, Adelsberger J, Zhou X, Stevens R, Rupert A, *et al.* The effects of storage temperature on PBMC gene expression. *BMC Immunol.* 2016;17(1):6. doi:10.1186/s12865-016-0144-1.

116. Kvarnström M, Jenmalm MC, Ekerfelt C. Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: an overall decrease of interleukin-4. *Cryobiology*. 2004;49(2):157–68. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.06.003.
117. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, *et al.* Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin. Exp. Immunol.* 2011;163(1):33–49. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x.
118. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15(1):707–47.
119. Mogensen TH, Paludan SR. Molecular Pathways in Virus-Induced Cytokine Production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001;65(1):131–50. doi: 10.1128/MMBR.65.1.131-150.2001.
120. Wolford RW, Macdonald MR, Zehfus B, Rogers TJ, Ferro2 AJ. Effect of 5'-methylthioadenosine and its analogs on murine lymphoid cell proliferation. *Cancer res.* 1981;41(8):3035-9.
121. Bigaud E, Corrales FJ. Methylthioadenosine (MTA) regulates liver cells proteome and methylproteome: implications in liver biology and disease. *Mol. Cell Proteomics.* 2016;15(5):1498-510. doi:10.1074/mcp.M115.055772.
122. Liu X, Berry CT, Ruthel G, Madara JJ, MacGillivray K, Gray CM, *et al.* T cell receptor-induced nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and transcriptional activation are regulated by STIM1- and Orai1-mediated calcium entry. *J. Biol. Chem.* 2016;291(16):8440–52. doi:10.1074/jbc.M115.713008.
123. Campbell DE, Fryga AS, Bol S, Kemp AS. Intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production in normal children and children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;115(3):377–82. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00814.x.
124. Baran J, Kowalczyk D, Ozóg M, Zembala M. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of

- phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001;8(2):303–13. doi:10.1128/CDLI.8.2.303-313.2001.
125. Antas PRZ, Sales JS, Pereira KC, Oliveira EB, Cunha KS, Sarno EN, *et al.* Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2004;37(8):1119–29. doi:10.1590/S0100-879X2004000800003.
 126. Barros N, Risco J, Rodríguez C, Sánchez C, González E, Tanaka Y, *et al.* CD4+ T cell subsets and Tax expression in HTLV-1 associated diseases. *Pathog. Glob. Health.* 2013;107(4):202–206. doi:10.1179/2047773213Y.0000000091.
 127. Hanon E, Goon P, Taylor GP, Hasegawa H, Tanaka Y, Weber JN, *et al.* High production of interferon but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 2001;98(3):721-6. doi:10.1182/blood.V98.3.721.
 128. Goon PKC, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, *et al.* High frequencies of Th1-type CD4 T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood.* 2002;99(9):3335-41. doi:10.1182/blood.V99.9.3335.
 129. Best I, Lopez G, Verdonck K, Gonzalez E, Tipismana M, Vanham G, *et al.* IFN-g production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4 + Foxp3 + and Lin) HLA-DR high CD123 + cells, discriminate HAM/ TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology.* 2009;128(1 Suppl):e777–e786. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03082.x.
 130. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología celular y molecular.* 8th ed. Barcelona: Elsevier; 2015. 1–50 p.
 131. Kim DK, Otten G, Moldwin RL, Dunn DE, Nau GJ, Fitch FW. PMA alone induces proliferation of some murine T cell clones but not others. *J. Immunol.* 1986;137(9):2755-60.
 132. Journo C, Mahieux R. HTLV-1 and innate immunity. *Viruses* 2011;3(8):1374–94.

doi:10.3390/v3081374.

133. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 2007;45(2):27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
134. Darwich L, Coma G, Peña R, Bellido R, Blanco EJJ, Este JA, *et al.* Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology.* 2009;126(3):386–393. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x.
135. Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LMI, Olah I, Duarte AJ da S, *et al.* The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand. J. Immunol.* 2009;70(4):403–7. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02291.x.
136. Rafatpanah H, Farid Hosseini R, Pourseyed SH. The impact of immune response on HTLV-I in HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2013;16(3):235–241.
137. Coutinho R, Grassi MFR, Korngold AB, Olavarria VN, Galvão-Castro B, Mascarenhas RE, *et al.* Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. *BMC Infect. Dis.* 2014;14(1):453. doi:10.1186/1471-2334-14-453.
138. Assone T, Kanashiro TM, Baldassin MPM, Paiva A, Haziot ME, Smid J, *et al.* In vitro basal T-cell proliferation among asymptomatic Human T cell Leukemia Virus type 1 patients co-infected with hepatitis C and/or Human Immunodeficiency Virus type 1. *Brazilian J. Infect. Dis.* 2018;22(2):106–12. doi:10.1016/j.bjid.2018.02.002.
139. Pinto LA, Galvão Castro B, Soares MBP, Grassi MFR. An Evaluation of the Spontaneous Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells in HTLV-1-Infected Individuals Using Flow Cytometry. *ISRN Oncol.* 2011;2011:326719. doi:10.5402/2011/326719.
140. Prince HE, York J, Golding J, Owen SM, Lal2 RB. Spontaneous lymphocyte proliferation in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) and HTLV-II Infection: T-cell subset responses and their relationships to the presence of provirus and viral antigen

- production. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994;1(3):273-82.
141. Lövborg H, Öberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor- κ B translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer.* 2006;118(6):1577–80. doi:10.1002/ijc.21534.
142. O’dea E, Hoffmann A. The Regulatory Logic of the NF- κ B Signaling System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2(1):a000216. doi:10.1101/cshperspect.a000216.

Anexos

Anexo 1

Tabla 5. Genes evaluados en el ensayo el superarray

Categoría	GenBank	Símbolo	Descripción
I	NM_005178	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
	NM_001166	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
	NM_001242	CD27	CD27 molecule
	NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
	NM_001278	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor
	NM_001992	F2R	Coagulation factor II (thrombin) receptor
	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
	NM_001556	IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
	NM_014002	IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
	NM_003639	IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
	NM_000572	IL10	Interleukin 10
	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha
	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta
	NM_000877	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
	NM_001569	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
	NM_001570	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
	NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1
	NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
	NM_002502	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)
	NM_002503	NFKBIB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
	NM_004556	NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
	NM_006092	NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
	NM_002908	REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
	NM_021975	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
	NM_006509	RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
	NM_003804	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
	NM_013254	TBK1	TANK-binding kinase 1
	NM_182919	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
	NM_021649	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2
	NM_003263	TLR1	Toll-like receptor 1
	NM_003264	TLR2	Toll-like receptor 2
	NM_003265	TLR3	Toll-like receptor 3
	NM_138554	TLR4	Toll-like receptor 4
	NM_006068	TLR6	Toll-like receptor 6
	NM_017442	TLR9	Toll-like receptor 9
	NM_006290	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
	NM_003844	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
	NM_001065	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A

	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
	NM_003807	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
	NM_003789	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
	NM_021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
	NM_003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
	NM_004620	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
II	NM_000029	AGT	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
	NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1
	NM_138578	BCL2L1	BCL2-like 1
	NM_001165	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
	NM_000757	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma
	NM_000584	IL8	Interleukin 8
	NM_000595	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
	NM_020529	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
III	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
	NM_005171	ATF1	Activating transcription factor 1
	NM_003921	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
	NM_032415	CARD11	Caspase recruitment domain family, member 11
	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
	NM_003879	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
	NM_001964	EGR1	Early growth response 1
	NM_005229	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
	NM_005252	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
	NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene
	NM_173844	MALT1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
	NM_005921	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
	NM_021144	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
	NM_002880	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
	NM_001664	RHOA	Ras homolog gene family, member A
	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
	NM_003254	TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1

Categoría: I, Genes relacionados a la señalización de la vía de NF- κ B; II, Genes que se expresan como respuesta a la activación de la vía de NF- κ B; y III, Otros genes involucrados.

Anexo 2

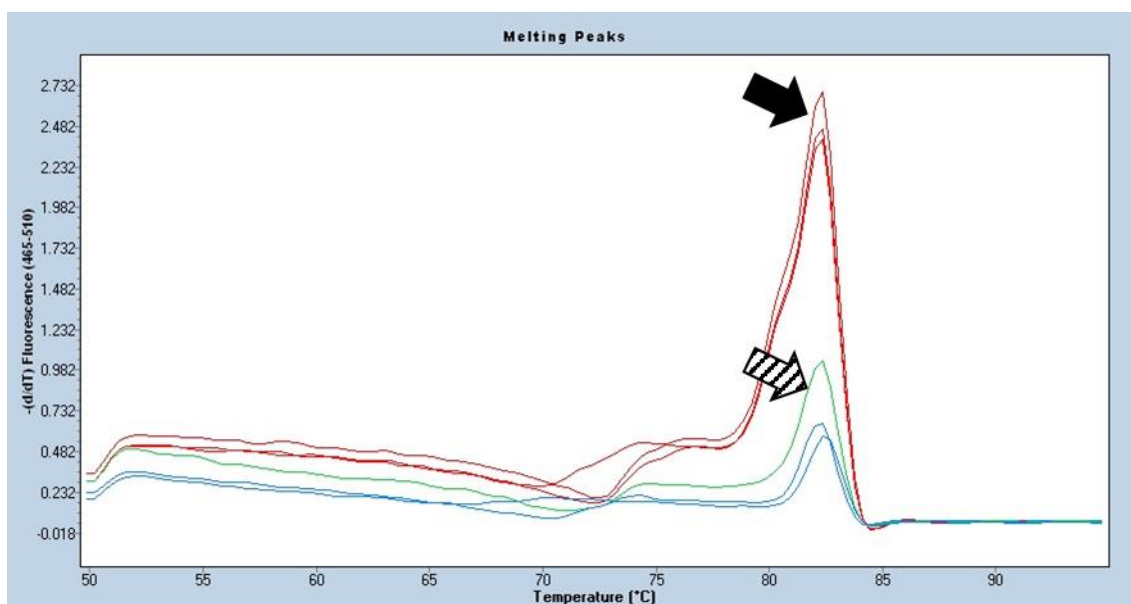


Figura 23. Picos de melting para el gen B2M pool 2 muestras. La flecha negra indica el pico de melting del producto del gen B2M. La flecha rayada indica el pico de melting de control sin transcriptasa reversa.

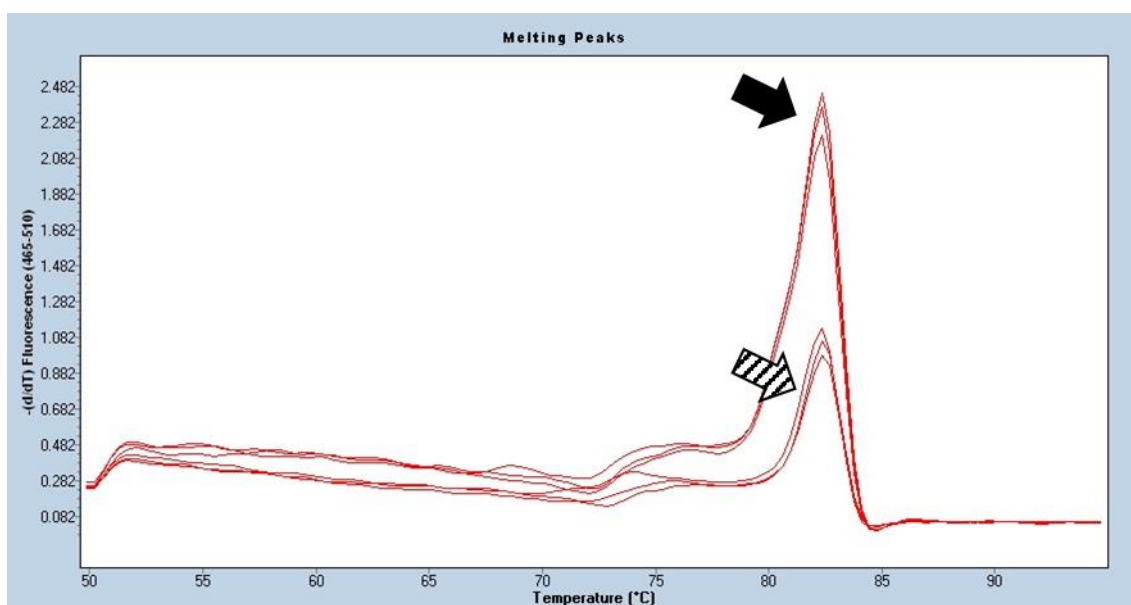


Figura 24. Picos de melting para el gen B2M pool 4 muestras. La flecha negra indica el pico de melting del producto del gen B2Ms. La flecha rayada indica el pico de melting de control sin transcriptasa reversa.

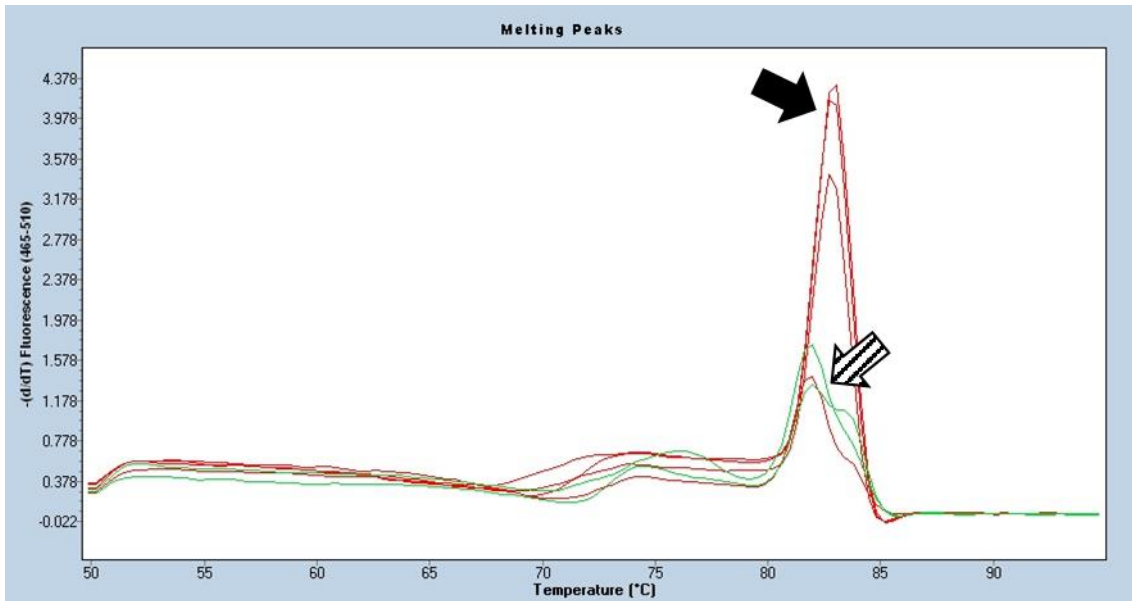


Figura 25. Picos de melting para el gen GAPDH pool 2 muestras. La flecha negra indica el pico de melting del producto del gen GAPDH. La flecha rayada indica el pico de melting de control sin transcriptasa reversa.

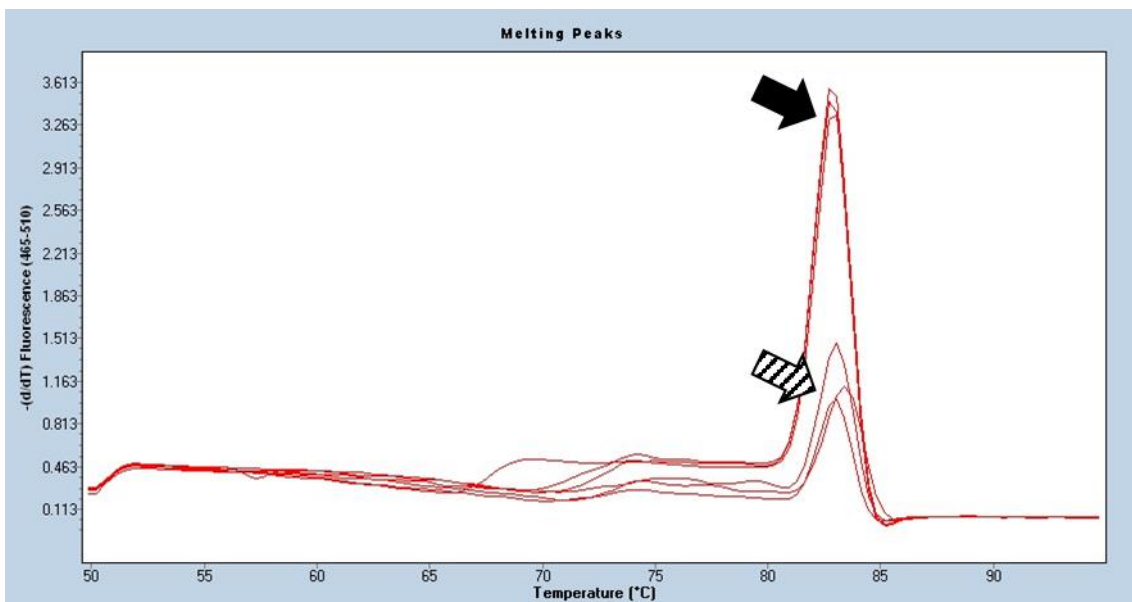


Figura 26. Picos de melting para el gen GAPDH, pool de 4 muestras. La flecha negra indica el pico de melting del producto del gen GAPDH. La flecha rayada indica el pico de melting de control sin transcriptasa reversa.

Anexo 3

Tabla 6. Ensayo RT-PCR para 2 genes de referencia.

Pool	Gen	Ct prom	% SD	-RT Ct prom	% SD	Ratio (ADNc/ADNg)
2	B2M	16.94	18	35	0	273 276.14
	GAPDH	22.26	71	34.59	35	5 148.72
4	B2M	17.47	24	35	0	189 258.68
	GAPDH	21.91	67	35	0	8 719.32

B2M, Beta 2 microglobulina; GAPDH, Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa; Ct prom, Ct promedio; %SD, porcentaje de desviación estándar; -RT, sin transcriptasa reversa.