



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE
PROTEÍNAS CON POTENCIAL USO
EN EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T
HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1)**

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

CLAUDIA OCAMPO ACUÑA

LIMA-PERÚ

2017

ASESORES

Jorge Arévalo Zelada, PhD (asesor)

Laboratorio de Pathoantígenos - Laboratorios de Investigación y Desarrollo,
Universidad Peruana Cayetano Heredia Lima, Perú

Michael Talledo Albuja, PhD (coasesor)

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana
Cayetano Heredia Lima, Perú

Agradecimientos

Quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que hicieron posible el desarrollo de este proyecto de Tesis. En especial, agradezco el apoyo invaluable del equipo de HTLV-1 y de los pacientes quienes donaron sus muestras. Asimismo, debo recalcar que no hubiera podido realizar mi investigación sin la asistencia técnica de los laboratorios de Pathoantígenos, la Unidad de Epidemiología Molecular, y del laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular.

Tabla de Contenido

Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Planteamiento de la investigación.....	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Planteamiento del problema.....	7
2.3. Justificación	10
3. Marco teórico	12
3.1. Epidemiología	12
3.2. Origen	14
3.3. Distribución de los genotipos de HTLV-1	15
3.4. Enfermedades asociadas a infección por HTLV-1.....	17
3.5. Diagnóstico y tratamiento	20
3.6. Modos de Transmisión.....	22
3.7. Genoma del virus linfotrópico Humano de células T (HTLV-1).....	24
3.8. Transmisión célula- célula	25
3.9. Clonalidad de HTLV-1	26
3.10. La diversidad genética de HTLV-1	26
3.11. Provirus defectivos.....	28
3.12. Tropicismo celular y entrada del virus HTLV-1.....	29
3.13. La respuesta inmune celular frente a HTLV-1.....	30
3.14. La respuesta de anticuerpos frente a Gag, Tax y Env	30
3.15. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	31
3.15.1. Alteración de las funciones de los linfocitos T CD4 (+).....	31
3.15.2. Infección de células dendríticas	31
3.15.3. Regulación de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTLs).....	32
3.16. Características funcionales de las proteínas Gag, Tax y Env.....	32
3.17. Características antigénicas de Gag, Tax y Env	33
4. Hipótesis	35
5. Objetivos	35
5.1. Objetivo general.....	35
5.2. Objetivos específicos	35
6. Materiales y métodos	36
6.1. Determinación de las secuencias consenso	36
6.1.1. Muestras	36
Criterios de inclusión	36
Criterios de exclusión	36
6.1.2. Amplificación proviral de los genes gag, tax y env	38
6.1.3. Secuenciamiento de los genes gag, tax y env	39
6.1.4. Obtención de secuencia consenso y análisis filogenético	40
6.2. Obtención de plásmidos recombinantes.....	42
6.3. Expresión de proteínas recombinantes.....	42
6.3.1. Expresión de las proteínas recombinantes rGag270 y rGag429, rTax153 y rTax353	42
6.3.2. Expresión de la proteína recombinante rEnv1	43

6.3.3.	Expresión de las proteínas recombinantes rEnv2 y rEnv488.....	43
6.3.4.	Purificación de proteína recombinantes por cromatografía de afinidad a níquel	44
6.3.5.	Separación de proteínas expresadas por SDS-PAGE.....	44
6.3.6.	Transferencia de proteínas en membrana de nitrocelulosa	45
6.3.7.	Ensayos de Western Blot con proteínas expresadas	45
6.4.	Caracterización diagnóstica de los extractos que contienen las proteínas recombinantes producida	46
6.4.1.	Panel de sueros.....	46
6.4.2.	Western Blot de los extractos que contienen las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env enfrentadas al panel de sueros	47
6.5.	Análisis estadístico.....	47
6.5.1.	Medición de parámetros de valoración diagnóstica	47
6.5.2.	Comparación de los extractos que contienen las proteínas recombinantes mediante análisis de áreas bajo las curvas ROC	50
7.	Resultados	52
7.1.1.	Determinación de las secuencias consenso de los genes gag, tax y env ...	52
7.1.2.	Análisis de la distribución filogenética de los genes gag, tax y env	54
7.1.3.	Producción de proteínas recombinantes.....	58
7.1.3.1.	Producción de las proteínas recombinantes rGag270 y rGag429	58
7.1.3.2.	Producción de las proteínas recombinantes rTax353 y rTax153	60
7.1.3.3.	Producción de la proteína recombinante rEnv1	62
7.1.3.4.	Producción de las proteínas recombinantes rEnv488 y rEnv2.....	64
7.1.4.	Caracterización diagnóstica de los extractos que contenieron las proteínas recombinantes de HTLV-1.....	65
8.	Discusión.....	69
8.1.	Determinación de secuencias consenso	69
8.2.	Análisis de la distribución filogenética de los genes gag, tax y env	72
8.3.	Producción de proteínas recombinantes.....	74
8.4.	Caracterización diagnóstica de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes	76
8.4.1.	Análisis de los parámetros de valoración diagnóstica.....	76
9.	Conclusiones	83
10.	Recomendaciones	83
11.	Bibliografía	84
Anexos		

Lista de figuras

Figura 1. Sistemas de manejo del candidato donante en bancos de sangre de Lima metropolitana

Figura 2. Distribución de la infección por HTLV-1 en el mundo

Figura 3. Origen de la infección por HTLV-1 en América

Figura 4. Distribución de la infección por HTLV-1 en el mundo

Figura 5. Microfotografía de células ATLL o flowers cells

Figura 6. Estrategia para el estudio familiar en la cohorte de HTLV-1 IMTAvH-UPCH

Figura 7. Modos de transmisión de la infección por HTLV-1

Figura 8. Genoma de HTLV-1

Figura 9. Árbol filogenético de subtipos y subgrupos de HTLV-1 construido a partir de la secuencia LTR del virus HTLV-1

Figura 10. Provirus defectivos en comparación con el provirus completo

Figura 11. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes Tax, Gag y Env según el lugar de Nacimiento

Figura 12. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes Tax, Gag y Env según el lugar de procedencia

Figura 13. Ubicación de los cebadores (primers) para la amplificación de los genes gag, env y tax

Figura 14. Árbol filogenético del gen gag

Figura 15. Árbol filogenético del gen tax

Figura 16. Árbol filogenético del gen env

Figura 17. Análisis de la expresión de la proteína rGag429 (53kDa)

Figura 18. Análisis de la expresión de la proteína rGag270 (23kDa)

Figura 19. Enfrentamiento de distintas concentraciones de rTax153

Figura 20. Western Blot de la expresión de la proteína rEnv1(23kDa) en *E.coli* BL21 (DE3), *E.coli* Lemo21 (DE3) y *E.coli* Rosetta (DE3)

Figura 21. Western Blot de la expresión de la proteína rEnv1 (23kDa) en *E.coli* Rosetta (DE3) y *E.coli* Lemo21 (DE3)

Figura 22. Enfrentamiento de rEnv2 con anticuerpo monoclonal anti-gp21-HTLV-1 por Western Blot

Figura 23. Curva ROC de las proteínas recombinantes de HTLV-1

Figura 24. Curva ROC teórica por par de proteínas

Lista de Tablas

Tabla 1. Prevalencia de HTLV-1 en Perú

Tabla 2. Enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1

Tabla 3. Proteínas usadas en el diagnóstico de HTLV-1

Tabla 4. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes *tax*, *gag* y *env* según manifestación clínica

Tabla 5. Concentración final de los reactivos a usar en la reacción de amplificación de los genes *gag*, *tax* y *env*.

Tabla 6. Protocolo de ciclaje para la amplificación de los genes *tax*, *env* y *gag*

Tabla 7. Cepas de referencia usadas en la construcción de los árboles filogenéticos

Tabla 8. Características de las proteínas recombinantes

Tabla 9. Anticuerpos Monoclonales usados en el Western Blot

Tabla 10. Muestras usadas en los ensayos de Western Blot

Tabla 11. Categorías TAPC según el área bajo la curva ROC

Tabla 12. Secuencias consenso de los genes *tax*, *gag* y *env*

Tabla 13. Parámetros de valoración diagnóstica de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes

Tabla 14. Áreas bajo las curvas ROC (ABC) de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes.

Tabla 15. Parámetros de valoración diagnóstica conjunta

Tabla 16. Área bajo la curva ROC teórica por cada par de proteínas

Tabla 17. Tabla de contingencia de rGag429

Tabla 18. Tabla de contingencia de rGag270

Tabla 19. Tabla de contingencia de rTax153

Tabla 20. Tabla de contingencia de rEnv1

Tabla 21. Tabla de contingencia de rEnv2

Lista de abreviaturas

ABC: Área Bajo la curva ROC

AC: Asintomático

ATLL: Leucemia/Linfoma de células T del adulto

CIOMS: Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas

CTL: linfocitos T citotóxicos

CD: Células Dendríticas

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

GLUT-1: transportador de glucosa 1

HSPG: Proteoglicano heparán sulfato

hnRNP A1: ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1

HTLV-1: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1

HTLV-1a: HTLV-1 subtipo a

HTLV-1b: HTLV-1 subtipo b

HTLV-1c: HTLV-1 subtipo c

HTLV-1d: HTLV-1 subtipo d

HTLV-1e: HTLV-1 subtipo e

HTLV-1f: HTLV-1 subtipo f

HTLV-1g: HTLV-1 subtipo g

HTLV-2: Virus linfotrópico de células T humanas tipo 2

IMTAvH: Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

INNO-LIA: Innogenetics line immunoassay

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

LB/CB/CL: Medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con 50µg/mL de Carbenicilina y 30µg/mL de Cloranfenicol

LIPS: Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems

LTR: Long Terminal Repeats

NRP-1: Neuropilina-1

ORF: Open Reading Frame

PCR.: Reacción en cadena de la polimerasa

PDR: Prueba de Diagnóstico Rápido

PET: Paraparesia Espástica Tropical

rEnv1: Proteína recombinante, fragmento de proteína Env de HTLV-1

rEnv2: Proteína recombinante, fragmento de proteína Env de HTLV-1

rGag270: Proteína recombinante, fragmento de proteína Gag de HTLV-1

rGag429: Proteína completa recombinante Gag de HTLV-1

RT: Transcriptasa reversa

rTax153: Proteína recombinante, fragmento de proteína Tax de HTLV-1

STLV: Simian T-Lymphotropic viruses

TAPC: Traditional Academic Point System

TBS: TBS Buffer Tris Salino

TTBS: TBS 1x con 0.05% de Tween-20(TTBS)

TTBS-BLOTTO: TTBS con 5% Leche

UPCH: Universidad Peruana Cayetano Heredia

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Resumen

Introducción: La infección por HTLV-1 es considerada una enfermedad desatendida, la cual afecta sobremanera a los más pobres. En nuestro país se ha estimado de 150 000 a 450 000 portadores infectados, cifra que puede ser mayor considerando que solamente representa lo observado en bancos de sangre y que solo el 10% presenta manifestación clínica asociada a la infección por este virus, por lo que el 90% restante al desconocer que está infectado expande el virus silenciosamente. Los bancos de sangre son el principal lugar que permite la captación de nuevos casos de infección por HTLV-1. Sin embargo, el sistema de manejo de los donantes de sangre impide poder captar todos los nuevos posibles casos, sumado a esto las deficiencias presentes en el descarte serológico de HTLV-1. Ante este panorama la generación de una prueba de diagnóstico rápido (PDR) sensible es una necesidad. **Materiales y métodos:** Como primer paso a la obtención de esta PDR, se amplificó secuencias proviral de 143 muestras de ADN de individuos con HTLV-1 confirmado con el fin de obtener una secuencia consenso. Posteriormente, con el uso de la secuencia consenso se realizó los ensayos de clonamiento para la posterior producción de las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env del virus HTLV-1. Subsecuentemente, se realizó la caracterización diagnóstica de las proteínas recombinantes producidas por medio de una prueba de Western blot; enfrentando las proteínas con un panel de sueros integrado por 31 muestras de HTLV-1 con pruebas confirmatorias positiva y 25 muestras negativas. Como prueba de referencia se usó al ELISA Biokit HTLV-I/II y PCR. **Resultados:** se obtuvo una sensibilidad de 100%, 100%, 97%, 87% y 19% con los extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes rGag429, rGag270, rTax153, rEnv1 y rEnv2, respectivamente. **Conclusión:** los extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes rTax153, rGag270 y rEnv1 permiten diferenciar infectados por HTLV-1 de los no infectados por el virus.

Palabras clave: HTLV-1, Secuencia consenso, Gag, Tax, Env, Western Blot.

Abstract

Introduction: HTLV-1 infection is a neglected disease, preferentially affects poor people. In Perú, an estimated 150,000 to 450,000 infected carriers have been reported, the real amount may be higher considering that it only represents what is observed in blood banks. Only 10% presents a clinical manifestation associated with the virus infection; the remaining are asymptomatic and expands the virus silently. Blood Banks are the principal place that allows the diagnosis of new cases of HTLV-1 infection. However, the management system of blood donors makes it impossible to diagnose and inform to all the new possible cases. In this scenario, the generation of a sensitive rapid diagnostic test (RDT) is a necessity.

Materials and methods: As a first step, in order to obtain a consensus sequence were amplified 143 DNA proviral sequences from individuals with confirmed HTLV-1. Subsequently, using the consensus sequence were perform cloning assays for the production of recombinant HTLV-1 proteins such us Gag, Tax and Env. After the recombinant proteins were expressed, western blot assays were performed. Facing proteins with a panel of sera consisting of 31 confirmed HTLV-1 positive samples and 25 negative samples. As a reference test to calculate Sensitivity were used HTLV-I / II ELISA and PCR assays. Results: a sensitivity of 100%, 100%, 97%, 87% and 19% was obtained with unpurified recombinant proteins rGag_429, rGag_270, rTax153, rEnv1 and rEnv2, respectively.

Conclusion: The unpurified recombinant proteins rTax153, rGag270 and rEnv1 allow to differentiate HTLV-1 infected and HTLV-1-uninfected.

1. Introducción

El virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), es un retrovirus oncogénico de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretroviridae* y género *Deltaretrovirus* (1). Fue aislado por primera vez en 1978 a partir de linfocitos cultivados de un paciente con linfoma cutáneo de células T (2) y reportado 2 años más tarde; cabe mencionar que fue descubierto antes que el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). HTLV-1 tiene tropismo por células del sistema inmunitario y sistema nervioso; infectando preferentemente linfocitos T CD4+. Además, como todo retrovirus, posee la capacidad de integrarse en el genoma celular y expandirse de célula a célula como provirus.

La infección por HTLV-1 afecta a una porción importante de la población mundial. Se calcula de 5 a 10 millones de infectados (3). Nuestro país es considerado endémico a la infección por HTLV-1 (4), se estima de 150,000 a 450,000 portadores de este virus (3); estimación basada solo en casos encontrados en centros materno-infantil y bancos de sangre por lo que la cantidad real de infectados sería mayor. Otro hecho que haría subestimar estos valores es que solo el 10% de las personas infectadas por HTLV-1 desarrollan enfermedades asociadas, permaneciendo el 90% restante como asintomáticos (AC) (5). El hecho de que la mayoría de personas se mantiene como asintomáticos haría que no acudan a los centros de salud y por lo tanto desconozcan que son portadores, transmitiendo el virus a sus parejas o hijos, dando como resultado la expansión silenciosa del virus.

El espectro de enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1 es variado, desde manifestaciones clínicas inflamatorias, neoplásicas y un incremento de infecciones oportunistas (6). El 0.25-4% de los pacientes infectados desarrolla la Leucemia/Linfoma de células T del adulto (ATLL) y entre 1-6% desarrolla la enfermedad inflamatoria neurológica degenerativa desmielinizante conocida como Paraparesia Espástica Tropical (PET) asociada a HTLV-1 (7, 8). Asimismo, se ha reportado que la infección por este virus incrementa el riesgo de presentar enfermedades oportunistas como Tuberculosis activa (9) y Estrongiloidiasis (10), enfermedades de importancia epidemiológica en nuestro país.

La infección por HTLV-1 no solo es de importancia en Salud pública, sino que además representa un impacto económico social por individuo, especialmente en los caso de pacientes con PET (11); ya que al no existir cura, tratamiento o vacuna la neurodegeneración progresiva no les permite usar sus extremidades inferiores con eficiencia, disminuyendo considerablemente las posibilidades de trabajar. En muchos casos las personas afectadas necesitan el cuidado de un familiar lo que genera más pobreza en estas familias. Otra implicancia económico social que posee la infección por HTLV-1 es su presencia en poblaciones vulnerables; se ha reportado una creciente incidencia de infección por HTLV-1 en poblaciones de escasos recursos y poco acceso a la atención médica como poblaciones de zonas rurales de la sierra (7); se ha reportado infección por HTLV-1 en 71 diferentes grupos indígenas de la Amazonía (12), en comunidades nativo quechuas (13) y comunidades nativas de la selva (14).

Los modos de transmisión de la infección por HTLV-1 son la transfusión sanguínea (15); contacto sexual (16); transmisión vertical madre-hijo y por lactancia materna (17). Si bien en los lugares endémicos a la infección por HTLV-1 la principal vía de transmisión es de madre-hijo, se considera a la transfusión sanguínea como el modo de transmisión del virus altamente efectivo. Un receptor de una unidad de sangre infectada con HTLV-1 puede presentar una tasa de seroconversión del 27-63% en el lapso de dos semanas (18). Asimismo, en un experimento *in vitro* fue demostrado que basta un mínimo de 10^8 linfocitos infectados para contraer la infección por HTLV-1 (19). Un individuo sano posee entre $1.1-3.5 \times 10^6$ linfocitos/mL en sangre periférica, una unidad de sangre es de 450mL de sangre, por lo que bastaría $\frac{1}{4}$ de unidad de sangre para infectarse. Esta sería la evidencia del motivo por el cual se le considera el modo más altamente efectivo para contraer la infección por HTLV-1.

En los bancos de sangre de distintos lugares del mundo se ha implementado el tamizaje para detectar donantes de sangre infectados por HTLV-1 y evitar que los receptores de unidades de sangre contraigan la infección. Entre los receptores de las unidades de sangre se tiene a los pacientes con cáncer, quemados, trasplantados o accidentados quienes en su estado presentan inmunosupresión, lo

que los haría más propensos a la infección de HTLV-1. En nuestro país, desde el año 1998 en los bancos de sangre se realiza de carácter obligatorio por Ley 26454, Ley que declara de orden público e interés nacional la obtención, donación, conservación, transfusión y suministro de sangre humana, el análisis de las unidades de sangre donadas con 7 pruebas para detectar anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, VIH, HTLV-I/II, Chagas, Sífilis y el antígeno nuclear del virus de la hepatitis B (20) y en zonas endémicas se les realiza 2 pruebas adicionales para descartar Malaria y Bartonelosis (21). Al asegurar la calidad de la sangre a ser donada mediante el tamizaje se ha prevenido que muchos receptores obtengan algunas de las enfermedades mencionadas. En un estudio entre los años 2008-2012 en 3 hospitales de Lima Metropolitana se encontró que 72,119 unidades de sangre fueron rechazadas por presentar reactividad a una de las enfermedades mencionadas, representando del 35-40% de las muestras donadas en estos 3 bancos de sangre, siendo descartadas al encontrarse contaminadas. En el caso de las unidades de sangre contaminadas por HTLV-1 se descartaron 1769 correspondientes al 0.7-1% de las donaciones en estos 3 bancos de sangre (22). Se estima que anualmente al tamizar las unidades de sangre y descartar infección por HTLV-1 se han prevenido entre 1,500-3,000 posibles infecciones (6).

2. Planteamiento de la investigación

2.1. Antecedentes

Los bancos de sangre son el principal lugar para detectar nuevos casos de infección por HTLV-1 (23); debido al tamizaje de HTLV-1 que se realiza en estos establecimiento de salud. En el escenario ideal el tener un diagnóstico rápido permitiría seleccionar a aquellos con reactividad positiva, informarles de su condición y evitar el contagio de otros individuos y así reducir la expansión del virus. Sin embargo, muchos nuevos casos no son captados y se pierden debido a que solo el 20% de los donantes recogen sus resultados y no reciben por lo tanto la asesoría clínica respectiva (22). Un reciente estudio realizado en bancos de sangre de 3 hospitales de Lima recabó información sobre los sistemas de manejo del candidato donante, reportando lo siguiente:

Existen dos sistemas de manejo de candidatos a donante (22) (ver Figura 1): 1) el primero empieza con una entrevista al postulante, se analiza la información de la entrevista y se selecciona a los candidatos, luego se realiza la toma de 4-9mL de sangre y se efectúa pruebas de tamizaje sobre la muestra (entregando los resultados dentro de las 24 horas). Si la muestra no presenta reactividad a las 7 pruebas realizadas, al día siguiente se hace la recolección de la unidad completa de sangre. Si se diera el caso que la muestra sea reactiva a HTLV-1 el paciente es derivado a Consejería y posteriormente al centro de referencia que se encargará de darle el seguimiento respectivo (ver Figura 1).

2) El segundo sistema de manejo del candidato donante empieza al igual que el sistema anterior con una entrevista y la selección de candidatos. Luego se le extrae la unidad de sangre a donar (450mL), posteriormente se realiza las pruebas de tamizaje y el resultado debe ser recogido a las 72 horas o a los 7 días (ver Figura 1).

El mismo estudio menciona la existencia de factores que imposibilitan la captación de nuevos casos en los bancos de sangre: a) La falta de recojo de resultados. b) La pérdida de información para contactar a los donantes. y c) No acudir al centro de referencia (22). Concluyeron que para evitar la pérdida de

nuevos casos por recojo de resultados y pérdida de información para contactarlos era necesaria una prueba de diagnóstico rápido (PDR) (22) que permita que los resultados se obtengan en pocos minutos, se informaría al paciente en ese momento y se evitaría esperar el recojo de los resultados o buscar la información de contacto en las entrevistas que en la mayoría de casos está incompleta antes de la donación de sangre.

Por otro lado, es importante mencionar otro hallazgo del mismo estudio, reportaron que luego de realizarles pruebas confirmatorias a las muestras inicialmente calificadas como positivas a HTLV-1; el 60% resultaron positivas, el 37% fueron negativas, y el 3% indeterminadas y se encontró 1 caso de HTLV-2 (22). Estos resultados sugieren que existe la necesidad de mejorar las pruebas de diagnóstico usadas en el tamizaje. No existe una prueba de oro (*gold standard*) para el diagnóstico de HTLV-1 y los valores de sensibilidad y especificidad de los kits usados en la actualidad son cuestionados por presentar discordancia entre ellos.

Las PDR para HTLV-1 y su uso extensivo en la actualidad no existen. Sin embargo, se reportó en 1999 un estudio que generó una PDR con las proteínas Gag, gp46Env y gp21Env recombinantes, cuyos resultados eran comparables con un ensayo de ELISA (24). Se desconoce el motivo por el cual en la actualidad no es usada la PDR mencionada.

Este hecho hace necesaria la generación de una PDR, lo que nos motiva a tratar de contribuir con la mejora del diagnóstico de HTLV-1, investigando sobre posibles proteínas de HTLV-1 candidatas para su utilización en diagnóstico para ser usada posteriormente la información recabada en la generación de la PDR.

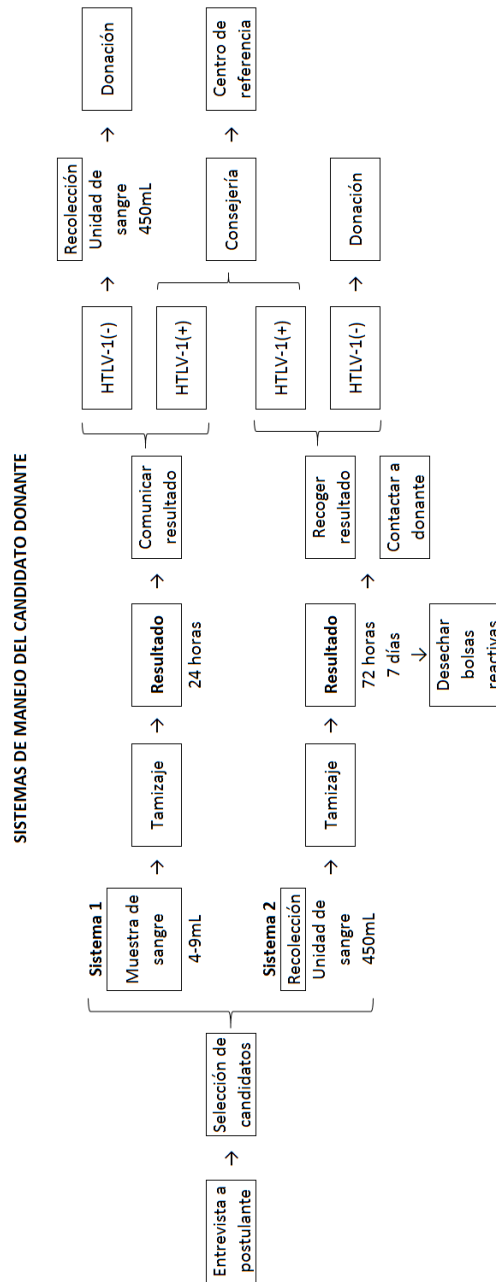


Figura 1. Sistemas de manejo del candidato donante en bancos de sangre de Lima metropolitana (22)

2.2. Planteamiento del problema

El Perú es considerado endémico para la infección por HTLV-1, aun así, el conocimiento sobre el virus es minoritario, debido a que la mayoría de infectados permanecen como asintomáticos y un 10% desarrolla enfermedad; este hecho puede ser una de las causas que conlleva a la expansión silenciosa del virus en nuestra población.

Los bancos de sangre son el principal lugar para detectar nuevos casos de infección por HTLV-1. Sin embargo, se pierden los posibles nuevos casos debido al tiempo que debe pasar en obtenerse los resultados del tamizaje y volver posteriormente para recoger sus resultados. No todos los donantes recogen sus resultados y en algunos casos no se puede contactar a los donantes con reactividad positiva a HTLV-1 para brindarles la asesoría médica correspondiente y evitar que se siga transmitiendo el virus. Este hecho hace necesario una prueba de diagnóstico rápido que permita que en pocos minutos se pueda obtener resultados y brindarles los resultados preliminares y la asesoría adecuada a los donantes para disminuir la expansión del virus en el momento, sin esperar su venida en días posteriores para recoger sus resultados.

Es así que siendo considerado el tamizaje en bancos de sangre la única estrategia de control de la infección por HTLV-1 en nuestro país (23) ; mejoras en este nivel permitirían eficientemente detectar nuevos casos y reducir la transmisión del virus. Y más aún con el uso de una PDR sensible que permita obtener resultados veraces en corto tiempo y prevenir nuevas infecciones.

Entonces, una PDR a este nivel permitiría reducir la incidencia de infección: Primero, porque el candidato a donante después de pocos minutos de realizada la prueba, tendría la oportunidad de ser informado; posteriormente se le realizaría pruebas confirmatorias pertinentes y se le brindaría la asesoría clínica respectiva. El que una persona conozca su condición clínica para HTLV-1 le permitiría tomar las medidas necesarias para minimizar el contagio y desarrollo de las graves manifestaciones clínicas asociadas a la infección con HTLV-1 tanto de su persona como de sus familiares. El detectar a una persona como seropositiva y conociendo

las vías de transmisión de este virus permitiría hacerles las pruebas a sus familiares para detectar la infección por HTLV-1.

Por otro lado, la generación de una PDR sensible permitiría reducir los costos asociados al descarte de unidades de sangre contaminadas; Un estudio realizado en el 2013 en 3 bancos de sangre, reportó 1,769 donadores con reactividad positiva a HTLV-1 entre los años 2008 y 2012 de 187,032 donaciones (22). Considerando que para el año 2000 el costo de una unidad de sangre costaba entre 172 y 388 nuevos soles (25), las 1,769 unidades de sangre con reactividad positiva a HTLV-1 representarían una pérdida de entre S/. 304,268.00 y 686,372.00 soles, sin contar recursos humanos, materiales utilizados para la extracción, almacenaje y eliminación de esas unidades reactivas a HTLV-1.

Con el desarrollo de una PDR se detectaría oportunamente a los donantes HTLV-1 positivos evitando que realicen donación de sangre, esto reduciría el número de unidades de sangre contaminadas por HTLV-1 por desechar, disminuyendo las pérdidas económicas relacionadas con éstas muestras.

Por otra parte, es necesario considerar que el 90% de infectados es asintomático, por lo que, al no presentar síntoma alguno de enfermedad, el individuo infectado desconoce que presenta el virus y lo transmite a otros individuos sin saberlo, inclusive a sus familiares. Sumado a esto el desconocimiento de la existencia de la infección por HTLV-1 en un país endémico como el nuestro. Por lo que la PDR generada podría ser usada en campañas de diagnóstico de HTLV-1 en la población y que por la obtención rápida de resultados se podrían detectar nuevos casos y brindarles consejería adecuada y así disminuir la expansión del virus en la población.

Además, la PDR generada podría ser usadas en zonas rurales de la selva y sierra, en dónde no se cuenta con equipos necesarios para realizar pruebas de diagnóstico rutinarias para el descarte de HTLV-1, como las pruebas de ELISA. Más aun considerando el incremento de la incidencia de HTLV-1 en estos lugares dónde su incidencia en poblaciones indígenas en zonas alejadas puede llegar al 9% (12).

Para el desarrollo de la PDR, primero se analizará la variabilidad genética de los genes *Gag*, *Tax* y *Env* para poder elegir una secuencia consenso que representen el acervo genético que permita generar posteriormente proteínas que puedan presentar reactividad con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con HTLV-1. Las proteínas recombinantes producidas serán enfrentadas a sueros de personas infectadas con HTLV-1 y personas no infectadas por HTLV-1 para caracterizar antigénicamente estas proteínas y usarlas en la PDR a generar posteriormente.

2.3. Justificación

En el Perú se estima que existen entre 150,000-450,000 pacientes infectados por HTLV-1 (3); siendo mucho mayor a la cantidad de infectados por VIH que se estima entre 61,000 a 100,000 (26). La mayoría de pacientes infectados se encuentra en estado asintomático, y desconocen su estado de seropositivos lo que haría que trasmitan el virus a sus parejas o hijos, dando como resultado la expansión silenciosa del HTLV-1.

En los bancos de sangre que son uno de los principales lugares donde se detectan a personas HTLV-1 positivas no se llega a brindar la asesoría clínica a todos los casos, porque solo el 20% de los donantes se acercan a recoger sus resultados debido a que éstos se obtienen entre 1-7 días de tomada la muestra. Esto crea la necesidad de generar una prueba de diagnóstico rápido que permita obtener resultados en tan solo 15 minutos. Esto permitiría que aquellos pacientes que se detecten como positivos a la infección puedan ser comunicados de inmediato y así tomar las medidas necesarias para el control de la expansión del virus.

En nuestro país no se ha desarrollado un estudio en el que se haya producido proteínas recombinantes de HTLV-1 con el propósito de generar una PDR sensible que pueda ser utilizada en bancos de sangre.

La producción de estas proteínas recombinantes no sólo servirá en la generación de una PDR, sino que a futuro con el uso de éstas proteínas podrá realizarse estudios de interacción proteína-ligando que permitirá conocer mejor los mecanismos de infección, evasión del virus y la respuesta inmune celular y humoral frente a la infección por HTLV-1, tanto en modelos celulares como animales.

Este estudio pretende analizar muestras de pacientes con diferentes enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1, procedentes de diferentes ciudades del país, con el propósito de analizar la diversidad de las secuencias de los genes *gag*, *tax* y *env*, para obtener secuencias consenso. A partir de las secuencias consenso se realizará la producción de proteínas recombinantes Gag, Tax y Env, las cuales se evaluarán frente a sueros de pacientes infectados y no infectados por HTLV-1 en

un ensayo de Western Blot, para identificar las proteínas que nos permitan diferenciar infectados por HTLV-1 de aquellos que no lo están, los hallazgos obtenidos serán usados en los ensayos posteriores para la generación de la PDR.

La razón por la que se eligió producir las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env es debido a que éstas presentan mayor cantidad de epítopes inmunodominantes que estimulan la producción de anticuerpos (27) comparado con otras proteínas de HTLV-1 (28).

Un estudio produjo proteínas recombinantes, Gag, Env, Tax, p12, p30, Rex y la Transcriptasa reversa(RT) de HTLV-1 en un vector mamífero y enfrentaron estas proteínas a sueros de pacientes de HTLV-1 mediante un ensayo de Inmunoprecipitación LIPS (*Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems*) y encontraron niveles bajos de anti-Rex y ausencia de anticuerpos anti-p12, anti-p30 y anti-RT (28). Al analizar las proteínas Gag, Tax y Env encontraron altos niveles de anticuerpos anti-Gag, anti-Env y anti-Tax (28); por lo que se consideró para la presente investigación el uso de estas proteínas como candidatas para la generación del PDR con el propósito de detectar más casos de HTLV-1 en un país endémico como el nuestro.

3. Marco teórico

3.1. Epidemiología

La infección por HTLV-1 está presente en Japón (29), en el Caribe (30), Melanesia (31), África (32) y en Sudamérica (33) (ver figura 2). Su distribución no es homogénea; existen focos de infección con prevalencia alta cercano a focos de prevalencia baja (11). Por ejemplo existe mayor prevalencia de infección por HTLV-1 en Japón pero en lugares cercanos como China y Corea la prevalencia es baja (11).

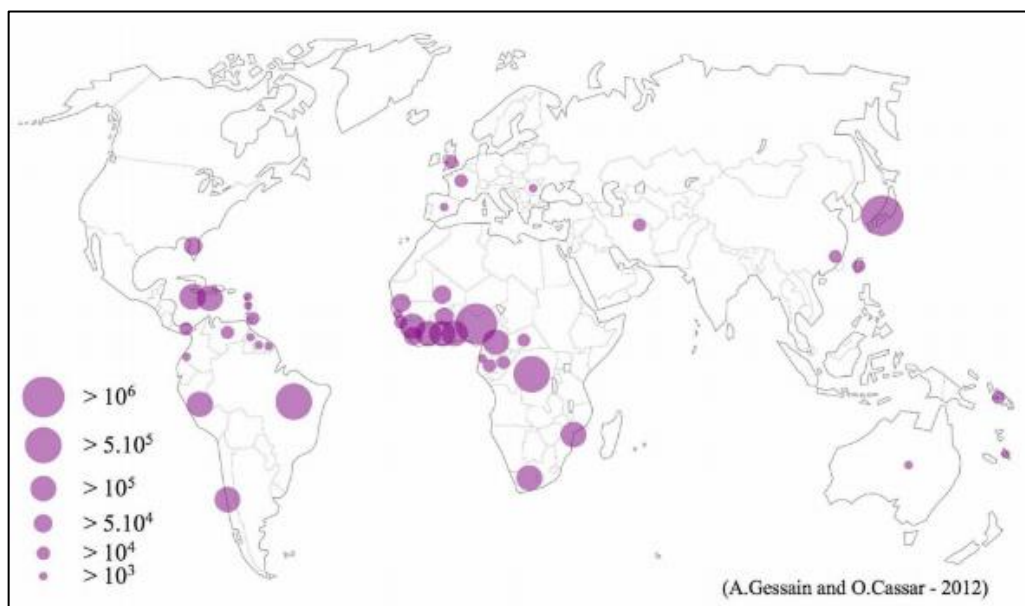


Figura 2. Distribución de la infección por HTLV-1 en el mundo (3)

Se ha estimado de 5-10 millones de infectados por HTLV-1 aproximadamente en el mundo (3). Sin embargo esta estimación se basa considerando una población mundial de 1.5 billones de individuos (34) por lo que la cantidad debe ser mayor, considerando que la población mundial en el 2013 fue de 7,125 billones.

Según el reporte del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), el cálculo de la cantidad estimada real de infectados presenta dificultades debido posiblemente a los siguientes 3 factores (35):

a) No se ha estudiado en muchas regiones la infección por HTLV-1, por lo que se desconoce cuál es la prevalencia de la infección por HTLV-1 en estas regiones; por ejemplo: no se tiene datos de la prevalencia de este virus en Ecuador, Bolivia, Paraguay y Uruguay (35), aun cuando Sudamérica representa un foco endémico de infección por HTLV-1.

b) En algunos lugares se estaría sobreestimando la prevalencia de la infección por HTLV-1 debido a que los métodos de diagnóstico presentan baja especificidad, como es el caso de lugares endémicos de Malaria donde se presume que las pruebas de serología para HTLV-1 presenta reactividad cruzada con Malaria.

c) Los cálculos de la estimación de la prevalencia estarían subestimando la cantidad real de infectados debido que la mayoría de estudios de prevalencia de infección por HTLV-1 se han basado solo en estudios en bancos de sangre, mujeres embarazadas y pacientes hospitalizados, los cuales no representan a la población en su totalidad.

Existen lugares donde se observan focos de infección con prevalencias altas como por ejemplo: las Islas Kyushu, Okinawa y Hokkaido donde se estima aproximadamente 1.1 millón de infectados (36). En el lado sudamericano, los países que presentan mayor prevalencia de infección por HTLV-1 son Brasil (300,000- 450,000), Perú (150,000-450,000) y Chile (90,000-250,000) que en otros países de Sudamérica (6).

En zonas endémicas la prevalencia de HTLV-1 varía de acuerdo a la edad, sexo y estado económico; en adultos la seroprevalencia se ha estimado de 1-2%, en adultos mayores de 50 años es del 20-40% (3). Por otro lado, es importante mencionar que la seroprevalencia es mayor en mujeres y que aumenta con la edad en este grupo (37). Además, se ha reportado mayor prevalencia de desarrollo de PET en mujeres que en hombres (38).

En nuestro país, se ha estimado aproximadamente de 150,000 a 450,000 infectados por HTLV-1 (3); la tabla 1 resume la prevalencia de infección por HTLV-1 en algunas poblaciones estudiadas en nuestro país. Distintos estudios en bancos de sangre reportaron la prevalencia de 1.2-1.7% (6) de infectados,

mientras que en mujeres embarazadas se ha reportado una prevalencia de 1.3-3.8% (6). Asimismo, se han detectado focos endémicos en comunidades nativas de la sierra y selva, zonas rurales de la sierra, así como en trabajadores sexuales (6).

Tabla 1. Prevalencia de HTLV-1 en Perú (6)

Prevalencia de HTLV-1 en Perú	
Población estudiada	% de individuos seropositivos
Donadores de sangre	1.2-1.7%
Mujeres embarazadas	1.3-3.8%
Trabajadoras sexuales	3.8-21.8%
Hombres que tienen sexo con otros hombres	0.9-6.3%

3.2. Origen

El origen del HTLV-1 se inició en África, por transmisión interespecie a partir de primates infectados con STLV (*Simian T-Lymphotropic viruses*) (39), la infección empezó en cazadores que por medio del consumo de primates-no humanos o mordidas de éstos obtuvieron el virus que se adaptó y evolucionó en el retrovirus que es ahora. Esta hipótesis de infección interespecie se encuentra reforzada por que aún ahora se sigue dando la transmisión interespecie en África Central, por ejemplo: se ha observado que estos virus son transmitidos eficientemente entre diferentes especies de primates no humanos (40) y porque se ha encontrado que el STLV-1 aislados de chimpancés y mandriles presentan alta homología con HTLV-1b y HTLV-1d (40) presentes en el humano.

Las migraciones humanas llevaron el virus de África hacia Asia, luego de Asia hacia Melanesia. Mientras que en el caso de la llegada del virus hacia América (ver figura 3), se tienen 2 hipótesis. La primera sugiere que HTLV-1 fue traído a Sudamérica por la migración prehistórica de hace 11,000-13,000 por el estrecho de Bering, llegó a Norte América, se esparció al Caribe para finalmente llegar a

Sudamérica (41). Esta hipótesis es reforzada por el hallazgo de la infección por HTLV-1 en una momia de 1500 años de antigüedad (42). La segunda hipótesis sugiere que el HTLV-1 provino de África hace aproximadamente 600 años llegó a Norteamérica, Estados Unidos, islas del Caribe y Sudamérica a través de la venida de esclavos en la colonia (41) (ver figura 3).

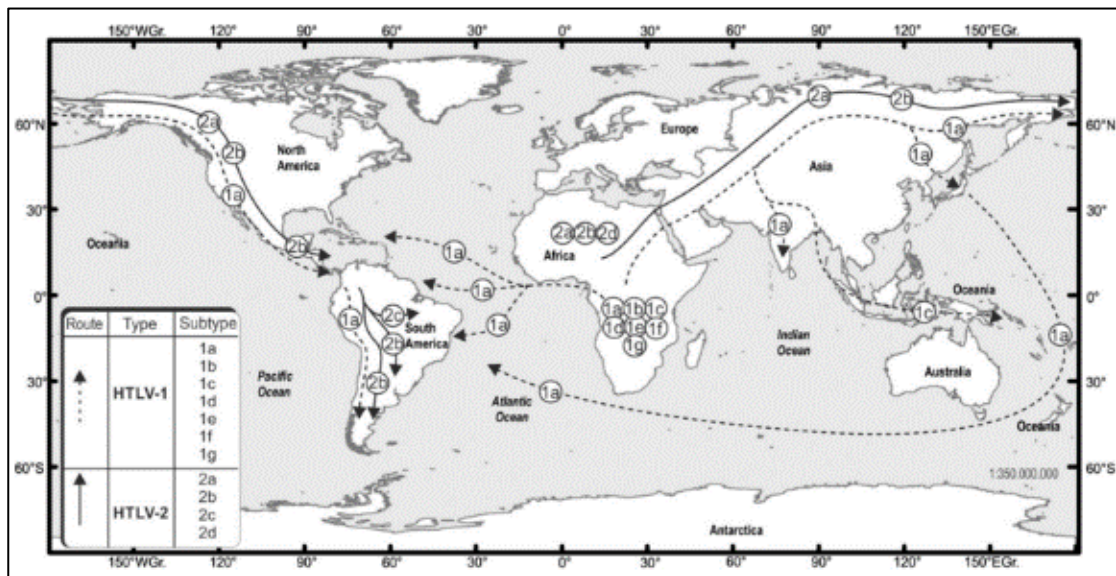


Figura 3. Origen de la infección por HTLV-1 en América (41)

3.3. Distribución de los genotipos de HTLV-1

Comparada con otros retrovirus, HTLV-1 presenta una velocidad evolutiva lenta de 0.4×10^{-7} - 6.8×10^{-7} sustituciones de base/año (43). Las mutaciones observadas en el genoma de HTLV-1 nos permiten relacionarlos con una región determinada y nos permite reconstruir la historia evolutiva del virus relacionada con las migraciones humanas. Según las mutaciones puntuales encontradas en HTLV-1 se ha podido determinar 7 genotipos los cuales pueden ser diferenciados tanto molecularmente como geográficamente (ver figura 4), estos son:

a) HTLV-1 subtipo a, denominado también como Cosmopolita; cuya prevalencia se ha encontrado en Japón, Sudamérica y África central. Dentro de este subtipo existen subgrupos siendo estos: subgrupo Transcontinental (A), el subgrupo

Japonés (B), subgrupo de África Oeste (C), subgrupo de África del norte (D) y el subgrupo Afroperuano (E).

b) HTLV-1 subtipo b: El cual principalmente se encuentra concentrado en África Central. Se ha reportado que el gen *gp21* de HTLV-1b presenta divergencia genética del 4% con HTLV-1a.

c) HTLV-1 subtipo c, encontrado en Australia-Melanesia. HTLV-1c filogenéticamente está más alejado que el resto de los subtipos. Se ha estimado que su llegada a Oceanía fue aproximadamente hace 60,000 años a partir de las migraciones humanas desde África (44). HTLV-1c presenta una divergencia genética de 8.5% con el subtipo HTLV-1a.

d) HTLV-1 subtipo d, concentrado en África Central y en aborígenes Pigmeos. Presenta una diversidad genética del 2.2% con HTLV-1a, mientras que diverge en 3.5% con HTLV-1d.

e) Otros subtipos de HTLV-1 son los e, f y g concentrados en poca cantidad principalmente en Gabón y el Zaire.

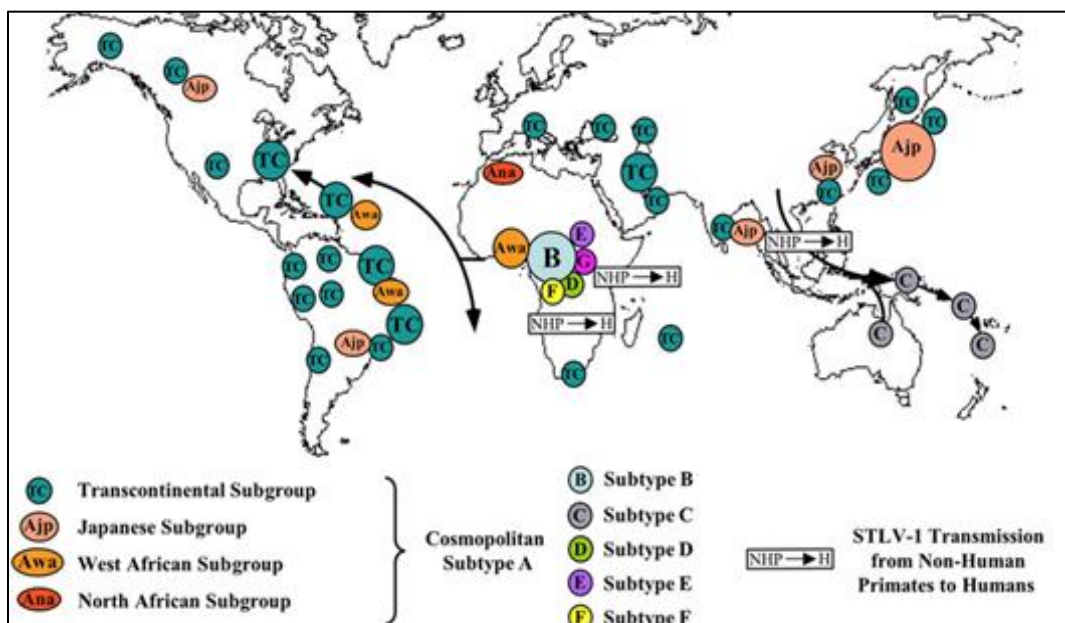


Figura 4. Distribución de la infección por HTLV-1 en el mundo. (3)

3.4. Enfermedades asociadas a infección por HTLV-1

Solo el 10% de los infectados por HTLV-1 desarrollan una de las enfermedades asociadas, las cuales han sido clasificadas en 3 grupos (6) (ver tabla 2):

Tabla 2. Enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1 (6)

Enfermedades asociadas con HTLV-1	
Categoría	Enfermedad
Enfermedades neoplásicas	Linfoma/leucemia de células T adulto (ATLL) Linfoma cutáneo Leucemia crónica de células B Linfoma de células T no-Hodgkin Carcinoma de células pequeñas Síndrome Sézary Leucemia linfocítica granular
Síndromes inflamatorios	Paraparesia espástica tropical (PET) Uveitis Artropatía Poliomiositis Tiroiditis Síndrome de Sjogren Alveolitis
Complicaciones infecciosas	Estrongiloidiasis Tuberculosis Lepra Sarna Bronquiectasias Paracoccidioidomicosis Dermatitis infecciosa

a) Enfermedades neoplásicas: En este grupo encontramos al Linfoma y leucemia de células T adulto (ATLL) y al Linfoma cutáneo asociados con la infección por HTLV-1 (2, 45), esta enfermedad se caracteriza por la presentación de células neoplásicas que presentan un núcleo multilobulado parecido a una flor por lo que se les conoce como “*flower cells*” (ver figura 5). Se ha determinado 5 tipos clínicos de ATLL: siendo estos agudo, crónico, latente o *smoldering*, linfoma y

pre-ATLL. ATLL agudo se caracteriza por el incremento de células ATLL, lesiones en la piel frecuentes, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia (46), así como hipercalcemia. Mientras que el estado crónico ATLL se caracteriza un mayor incremento de células ATLL y otras líneas celulares linfoides involucradas con la inflamación (46). En cuanto al *Smoldering* ATLL en este se observa la presencia de pocas células ATLL en sangre periférica, además de presentar lesiones en piel y pulmones (46). Varios casos de ATLL crónico y ATLL latente progresan a ATLL agudo. Por último, el Linfoma ATLL se caracteriza porque presenta pocas células anormales en sangre periférica y muchas células ATLL a nivel de los nodos linfáticos (46). Es importante mencionar que se ha considerado un estado clínico llamado pre-ATLL el cual se ha observado en pacientes infectados con HTLV-1 asintomáticos que presentan linfocitos anormales en sangre periférica, se ha descrito que 1 de cada 4 Pre-ATLL progresan a ATLL (47).

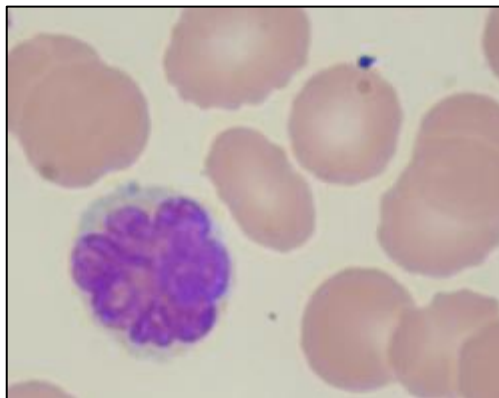


Figura 5. Microfotografía de células ATLL o *flowers cells*. Fuente Giovanni López-IMTAvH

El desarrollo de estas enfermedades neoplásicas se debe a que principalmente el virus infecta linfocitos T CD4+ y que para sobrevivir manipula la maquinaria celular de estas células, primero induce la expansión clonal y en cada una de ellas se producen proteínas virales como es el caso de la proteína Tax que manipula vías de señalización celular relacionadas con la proliferación celular y la apoptosis (48), generan una acumulación de daño en el ADN, lo que lleva a la generación de células inmortales.

Con menor frecuencia se han asociado la infección por HTLV-1 al desarrollo de otras neoplasias como la leucemia crónica linfocítica de células B (49), Linfoma de células T no-Hodgkin (50), Cáncer pulmonar de células pequeñas (51), Leucemia prolinfocítica, carcinoma de células pequeñas, síndrome Sézary, leucemia granular de células T grandes (52, 53).

b) Síndromes inflamatorios: En este grupo encontramos a la Paraparesia espástica tropical (PET) (8), Uveítis (54), Artropatía (55), Poliomiocitis (56), Tiroiditis (57), Alveolitis (58), Linfadenitis y Síndrome de Sjogren (11). Entre los síndromes inflamatorios el más frecuente es el desarrollo de PET con 1-6% (7). La Paraparesia espástica tropical es una meningomielitis crónica neurodegenerativa de la sustancia blanca y gris de la espina dorsal con desmielinación y degeneración del axón que se caracteriza por presentarse deterioro en la movilidad de los miembros inferiores, disfunción de esfínteres, dolor de espalda (8). Se ha reportado que por cada 2 hombres infectados 3 mujeres infectadas desarrollarían PET (59), por lo que se hipotetiza que las mujeres tienen una mayor probabilidad de desarrollar PET. Otro factor que está relacionado con el riesgo de desarrollar PET es presentar altos niveles de carga (60).

Los pacientes con PET presentan mayor carga viral que los asintomáticos, sin embargo, muchos infectados por HTLV-1 con niveles de carga proviral alta se mantienen como asintomáticos. Algunos estudios reportan que la presencia del alelo HLA-DRB1*0101 puede conferir susceptibilidad al desarrollo de PET (61, 62), así como polimorfismos en los genes de TNF- α e Interleuquina 15 (63), asociación que no ha sido observada en nuestro país (64). Lo cual hace que no se conozca realmente todos los factores que expliquen la presencia de PET en pacientes infectados por HTLV-1.

Se propone que la presencia de PET en los pacientes infectados con HTLV-1 se debe a la generación de un proceso inflamatorio crónico (48) el cual está relacionado al incremento de linfocitos T CD4+ infectados efectoros que migran a los tejidos como sistema nervioso central, pulmones, articulaciones y la úvea (48)

y producen en grandes cantidades IFN- γ que media la inflamación crónica (65) en estos tejidos.

c) Complicaciones infecciosas: En este grupo encontramos a la Estrongiloidiasis, Tuberculosis, Lepra, Sarna, Bronquiectasias, Paracoccidiodomicosis y Dermatitis infectiva. Una de las razones por las que podrían generarse estas enfermedades es que el virus infecta linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ los cuales disminuyen la respuesta inmune generando inmunosupresión (48) lo que conllevaría a la presentación de infecciones oportunistas. Se ha reportado que los pacientes con HTLV-1 presentan mayor porcentaje de infección oportunistas que la población general (66-68), asimismo individuos infectados con HTLV-1 presentan casos más severos de Estrongiloidiasis (10).

3.5. Diagnóstico y tratamiento

Para el diagnóstico de la infección por HTLV-1 se sugiere realizar 2 ensayos de ELISA de distinta marca comercial. A todas las muestras con reactividad positiva se les realiza pruebas confirmatorias de Western blot e INNO-LIA (*Innogenetics line immunoassay*), todas estas utilizan suero de pacientes.

Otra prueba usada como prueba confirmatoria es el PCR de provirus, con el cual se aísla ADN proviral a partir de células mononucleares de sangre periférica y se amplifican los genes *tax* o *pol*. La ventaja del uso del ensayo de PCR como prueba confirmatoria nos permite discriminar HTLV-1 de HTLV-2 así como descartar aquellos que obtuvieron patrones indeterminados con el Western blot y Falsos positivos. La existencia de estos patrones indeterminados observados en el WB podría aparecer por infección por otros virus como HTLV-2 o HIV (69).

Actualmente en los bancos de sangre de nuestro país se realiza el tamizaje de HTLV-1 mediante el uso del Kit de diagnóstico HTLV I/II ELISA, aquellos donantes con reactividad positiva son remitidos al centro de referencia de HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt (IMTA_{vH}) para realizarles pruebas confirmatorias de Western Blot o PCR.

A los pacientes, se les brinda información sobre la infección por HTLV-1, los modos de transmisión y las manifestaciones clínicas relacionadas a HTLV-1. El IMTA_{vH} considerando los modos de transmisión ha optado por invitar a los familiares consanguíneos y no consanguíneos de aquella persona seropositiva con HTLV-1 para que se realicen el diagnóstico de HTLV-1 (ver figura 6), se invita dependiendo el caso (a la pareja, los padres o hijos de dicha persona). Asimismo, si los padres son seropositivos se invita a realizarse una prueba de detección de HTLV-1 a los hermanos del primer individuo captado (6).

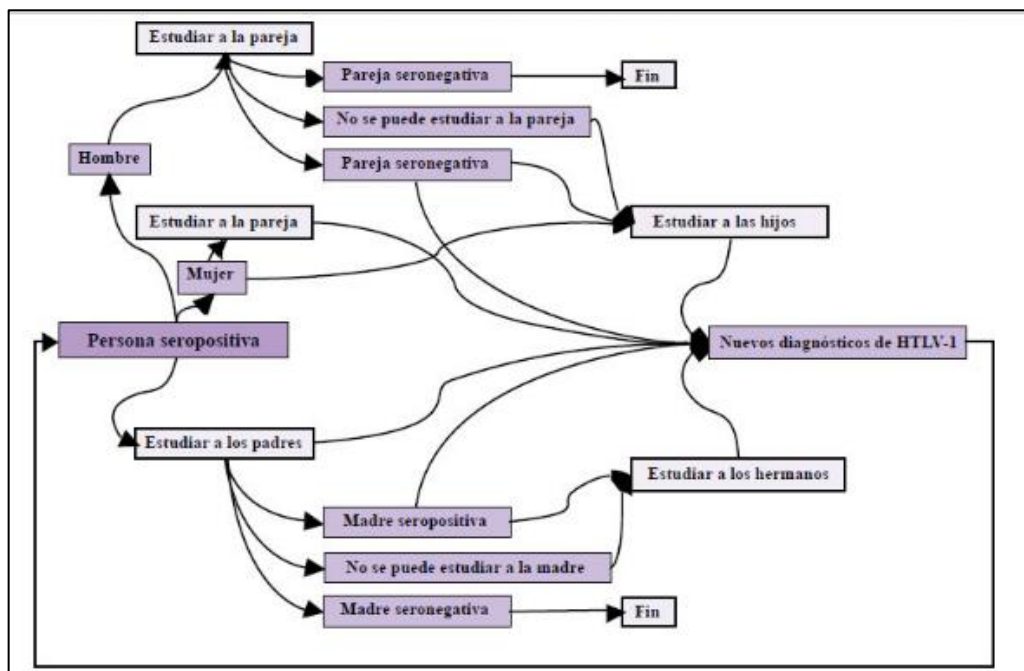


Figura 6. Estrategia para el estudio familiar en la cohorte de HTLV-1 IMTA_{vH}-UPCH (6)

Por otro lado, hasta ahora no existe un tratamiento efectivo para la infección por HTLV-1 (70). Sin embargo, se han reportado estudios en pacientes que desarrollaron ATLL y PET el uso de Zidovudine e Interferón- α (71) y Raltegravir (72); los cuales son usados en el tratamiento de HIV mostrando resultados favorables en la infección por HTLV-1.

Además, como cualquier otro tipo de neoplasia, en el caso del tratamiento de pacientes que desarrollan ATLL se considera el tipo de caso y se realiza trasplante

de médula ósea, quimioterapia, pero con resultados poco alentadores como en otros tipos de leucemias. Se ha observado que las formas agresivas de ATLL (aguda y linfoma) son resistentes a la quimioterapia y muchos de los pacientes por la quimioterapia presentan inmunosupresión por lo que los pacientes deben ser tratados también por enfermedades oportunistas (47).

3.6. Modos de Transmisión

La infección por HTLV-1 puede ser adquirida mediante 3 modos de transmisión (ver figura 7).

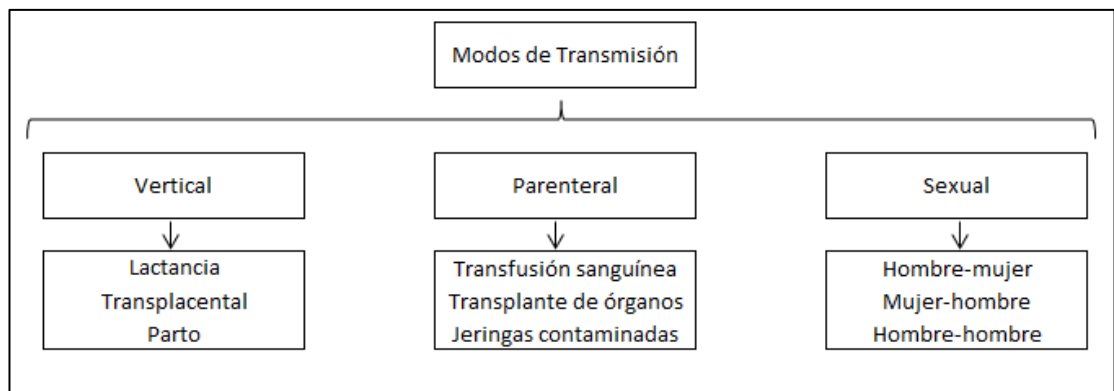


Figura 7. Modos de transmisión de la infección por HTLV-1

a) Transmisión Vertical

La mayoría de casos de Transmisión Vertical Madre-hijo es por lactancia materna, sin embargo se han reportado casos raros de transmisión vertical durante la gestación o durante el parto (6, 73, 74), en este sentido se considera a la lactancia materna como el modo más eficiente de transmisión vertical de HTLV-1, es más se ha reportado que el 20% de infantes alimentados con leche materna de sus madres infectadas con HTLV-1 presentaron seroconversión, mientras que solo el 1-2% que fueron alimentados por biberón presentaron infección por HTLV-1.

Varios estudios han reportado que la lactancia prolongada está asociada con el riesgo de transmitir el HTLV-1 de madre a hijo; en un estudio realizado en la zona endémica de Okinawa observó que al reducir el tiempo de lactancia disminuyen los nuevos casos de transmisión por lactancia materna (75). La lactancia por más

de 6 meses es 3 veces más riesgosa de transmitir el virus que en lactancia menor a 6 meses (76). En nuestro país, la tasa de transmisión vertical se ha estimado entre 6% y 18% (77, 78).

Además, en aquellos hijos cuyas madres que presentan coinfección HTLV-1 y Estrongiloidiasis tienen un riesgo mayor de 11.5 veces más de presentar HTLV-1 que en hijos de madres seropositivas asintomáticas (77). Mientras que en hijos de madres seropositivas con PET tienen un riesgo de 8.3 veces más de presentar infección que en hijos de madres asintomáticas (77), esto probablemente debido a que los pacientes con PET presentan mayor carga proviral que los asintomáticos lo cual está asociado a mayor carga proviral en la leche (77, 79, 80).

c) Transmisión Parenteral

Otra forma por la que se contrae la infección por HTLV-1 es mediante la recepción de productos de sangre contaminada (linfocitos infectados con HTLV-1) el cual es responsable de la adquisición de infección por HTLV-1 en receptores de donación (15-60%). También se transmite por trasplante de órganos y por el uso de agujas contaminadas. La transmisión parenteral es la vía más eficiente de transmisión de HTLV-1, en este sentido se ha reportado que basta que un receptor reciba una unidad de sangre infectada con HTLV-1 para presentar una tasa de seroconversión del 27-63% en un lapso de dos semanas (18).

b) Transmisión Sexual

La infección por HTLV-1 puede obtenerse mediante contacto sexual. Se ha detectado la presencia de HTLV-1 en células mononucleares del semen (81) y ha sido aislado de secreciones cervicales (82) en infectados por HTLV-1. Se ha estimado que la incidencia de transmisión sexual es de 1 por 100 personas (83). Además, se ha reportado que existe mayor probabilidad de contagio de hombre a mujer que al revés (84) y esto es posiblemente debido a que la carga proviral aumenta con la edad y los cambios postmenopáusicos del epitelio vaginal aumentan el riesgo de contraer el virus (85).

3.7. Genoma del virus linfotrópico Humano de células T (HTLV-1)

El Virus Linfotrópico Humano de células T tipo 1 (HTLV-1) es un virus de 100nm de diámetro aproximadamente (52), cuyo genoma es de 8.5 kilobases, el cual consiste en 2 cadenas de ARN lineal con sentido positivo. Como todo retrovirus codifica una Transcriptasa reversa que permite convertir una cadena de ARN en una doble cadena de ADN, codifica además una Integrasa que permite que la doble cadena de ADN transportada al núcleo se integre en el cromosoma de la célula hospedera y se mantenga como provirus.

El provirus contiene 2 secuencias LTR (*Long Terminal Repeats*) flanqueantes (ver figura 8) que contienen elementos para el inicio de la transcripción como un promotor y *enhancers*; asimismo, presenta en su 3'LTR señales de poliadenilación para la transcripción de la cadena positiva del provirus (2).

Además, el genoma de HTLV-1 presenta más de 5 ORFs (*Open Reading Frames*) que permiten la codificación de distintas proteínas funcionales, estructurales y regulatorias, por ejemplo, codificado por *gag* tenemos a las proteínas estructurales p19, p24 y p15 que permiten la protección del material genético del virus; mientras que, codificadas por *env* a las proteínas de la envoltura viral gp46 y gp21. HTLV-1, codifica otros ORFs en su genoma viral que permite la expresión de las proteínas regulatorias: Tax, Rex, p12, p30, p13 y HBZ que modulan la transcripción y la replicación del virus para mantener al virus en la célula y permitir la proliferación de las células infectadas.

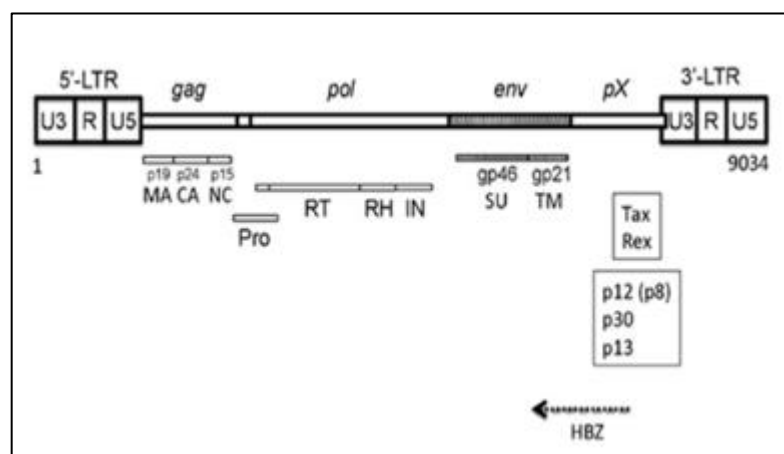


Figura 8. Genoma de HTLV-1 (86)

3.8. Transmisión célula- célula

HTLV-1 y HTLV-2 se diferencian de otros retrovirus por su modo de transmisión célula-célula dentro del hospedero. Mientras que otros retrovirus se esparcen al producir partículas virales que se liberan de la célula y salen al fluido extracelular para infectar nuevas células; HTLV-1 se transmite principalmente mediante la interacción célula-célula (87), razón por la cual es raro encontrar viriones fuera de la células o en plasma de infectados por HTLV-1 (88).

En la infección por HTLV-1, la transmisión célula-célula es más eficiente que la de partículas virales que salen de las células. Estudios de transfusión sugieren que el contacto célula-célula es requerido para la transmisión de HTLV-1. Aquellos individuos que reciben componentes celulares sanguíneos (toda la sangre, glóbulos rojos o plaquetas) se infectan con el virus comparado con aquellos que solo reciben productos no celulares de la sangre como fracciones de plasma o derivados de plasma (89).

En un estudio de comparación de varios retrovirus encontró que la transfusión de plasma de VIH originaba la infección en el 89% de los casos, mientras que en los casos de transfusión de plasma infectado por HTLV-1 no se infectaron los pacientes (88).

Se han identificado 2 formas de transmisión célula-célula:

A) Transmisión linfocitos T CD4+ infectado- linfocito T CD4+

La principal célula blanco para la infección de HTLV-1 son los linfocitos T CD4+, estos son importantes porque son requeridos para una adecuada respuesta de anticuerpos y respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+. La transmisión empieza con la sinapsis virológica que empieza por mantener el contacto célula infectada-célula no infectada, luego RNAs y proteínas Env y Gag salen de la célula infectada e ingresan a la célula no infectada (90).

B) Células Dendríticas (CD) infectado - linfocito T CD4+

La transmisión por medio de las CD ocurre de 2 formas; la primera denominada fase temprana o tras-infección consiste en que la CD captura un virión y lo

transfiere a un linfocito T CD4+. Mientras que la segunda es denominada fase tardía o cis-infección que consiste en que un virión infecta una CD, manipulando la maquinaria celular y produce nuevos viriones que se transmiten a los linfocito T CD4+ (48). La ventaja de la transmisión mediante las CD permite la evasión de la respuesta inmune, además al ser la mayor presentadora de antígenos permite que más linfocitos T CD4+ se infecten eficientemente por sinapsis virológica.

Posteriormente, los linfocitos T CD4+ proliferarán por mitosis llevando consigo al provirus que tiene el mismo sitio de integración (91). Un individuo presenta numerosas clonas (diferencias por su sitio de integración). En casos de pacientes con ATLL se observa principalmente la proliferación de una de estas clonas, existiendo las demás en mucho menos proporción. En el caso de otras manifestaciones en la infección por HTLV-1 se ha estimado que se puede tener hasta 100 clonas en circulación (91).

3.9. Clonalidad de HTLV-1

Luego de infectada una célula con el virus, el ARN viral se retrotranscribe a ADN proviral tras usar su transcriptasa inversa e integrarse. Puede integrarse en distintos lugares del genoma del hospedero generando diferentes clonas. La (s) las clona (s) que logren sobrevivir al ataque del sistema inmune y que alcancen mejor la capacidad de adaptación son las que se propagaran por mitosis (92). Éstas clonas pueden pasar desapercibidas por el sistema inmunológico por varios años, se ha reportado que en pacientes ATLL de 500-5000 clonas se mantienen por años circulando en estos pacientes (93) hasta que una es la que principalmente prolifera.

3.10. La diversidad genética de HTLV-1

El genoma proviral de HTLV-1 es altamente conservado. Se ha descrito que la secuencia de HTLV-1 es más estable que otros virus de ARN (94). Esta alta estabilidad genética es debido a la expansión clonal del virus integrado en el genoma celular, que se da por mitosis. La replicación del genoma proviral por expansión clonal permite que el virus posea una tasa baja de sustitución de nucleótidos (92), lo que trae como consecuencia una tasa baja en su evolución genética (95) y que se encuentre conservado comparado con otros retrovirus.

La conservación del genoma de HTLV-1 por medio de la expansión clonal debe a la tasa de mutación baja de las células somáticas humanas, que se ha estimado de 1.4×10^{-10} /nucleótidos/célula/división y de 2.0×10^{-7} /mutaciones/gen/división celular, considerando lo mencionado se ha estimado que la frecuencia de mutación promedio por linfocito infectado por HTLV-1 es de 10^6 (94).

Otra razón por la cual la estabilidad del genoma proviral de HTLV-1 frente a otros virus es mayor se debe a que su transcriptasa inversa posee una tasa menor de incorporación errónea de 7×10^{-6} /bases/ciclo (96), mientras que por ejemplo en VIH es de 3.5×10^{-5} /bases/ciclo (96). Esta estabilidad se puede observar por ejemplo, en la variabilidad de las proteínas de envoltura de HTLV-1 entre pacientes es menor que la observada en la proteína de envoltura de VIH (97). Desde que fue por primera vez conocida la secuencia de HTLV-1 en 1983, se ha observado que el virus es genéticamente estable (94), es así que la velocidad evolutiva de HTLV-1 es lenta, de 0.4×10^{-7} - 6.8×10^{-7} sustituciones de base/año (43).

Mediante el análisis genético del LTR se pueden diferenciar distintos genotipos de HTLV-1 que pueden ser relacionados con un área geográfica determinada (98) (ver figura 9). Es así que tenemos al subtipo HTLV1c y HTLV1a son divergentes, y que HTLV1c presenta cercanía evolutiva con HTLV1b. El subtipo HTLV1a o Cosmopolita presenta diferentes subgrupos que pueden ser diferenciados geográficamente, sin embargo, en algunos casos nos brinda información del origen de un determinado genotipo en una región determinada, por ejemplo, se observa que el subgrupo Transcontinental tiene cercanía con el subgrupo Sudáfrica y se encuentra más divergente que con el subgrupo japonés.

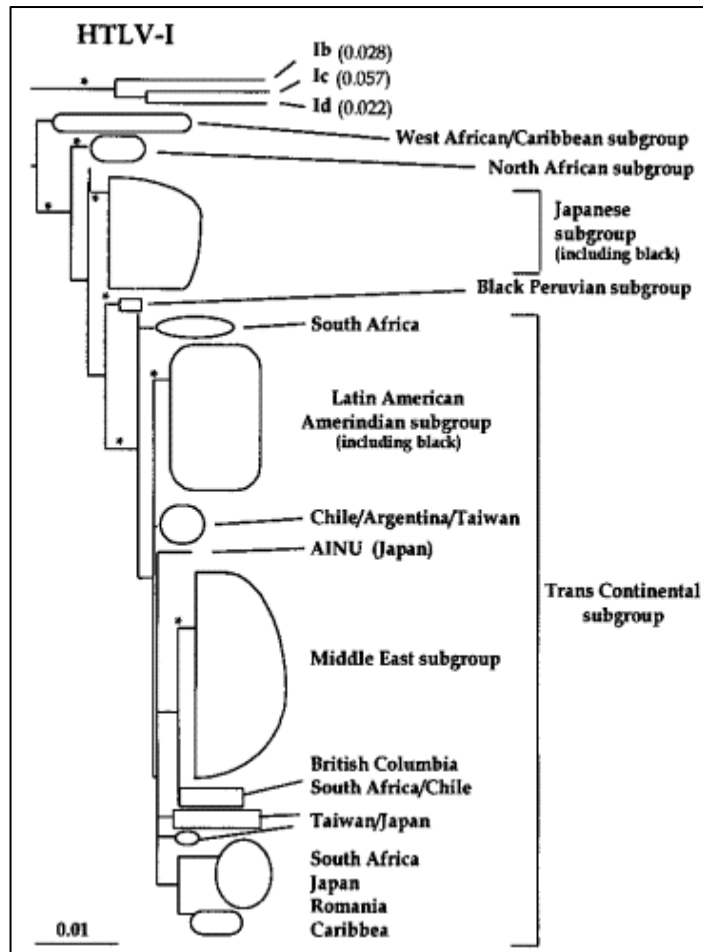


Figura 9. Árbol filogenético de subtipos y subgrupos de HTLV-1 construido a partir de la secuencia LTR del virus HTLV-1 (98).

3.11. Provirus defectivos

Se ha reportado la presencia de provirus defectivos de HTLV-1 en muchos casos de pacientes con ATLL (99), PET (100) y asintomáticos y se piensa que podrían tener un rol patogénico. Se ha reportado 2 tipos de deleciones de los provirus (101) diferenciando así en provirus defectivo tipo 1 y 2 (ver figura 10); el primero se caracteriza por mantener los LTRs extremos pero se pierden secuencias internas como *gag* y *pol*; mientras que el tipo 2; se caracteriza por tener solo un LTR extremo y está delecionado el resto del genoma.

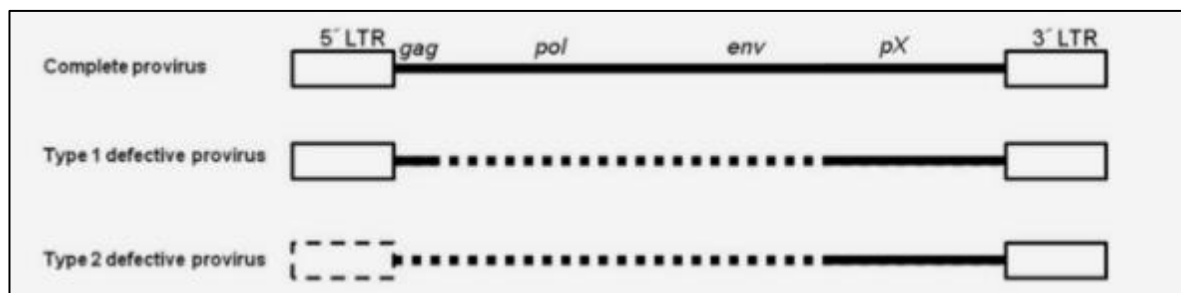


Figura 10. Provirus defectivos en comparación con el provirus completo (102)

3.12. Tropismo celular y entrada del virus HTLV-1

Principalmente el virus HTLV-1 infecta linfocitos T CD4+, pero pueden infectar linfocitos T CD8+ (103), linfocitos B (104), células dendríticas (105), monocitos (104), células endoteliales (106), sinoviales (107) y células gliales como astrocitos y microglías (108). Las partículas virales recientemente sintetizadas entran a la célula a infectar por medio de la acción de las proteínas de la envoltura; la proteína viral gp46 reconoce en la superficie de la células blanco las siguientes proteínas : el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), Neuropilina-1 (NRP-1) y el proteoglicano heparán sulfato (HSPG), se unen tras el reconocimiento para luego la proteína gp21 estabilizar la unión y fusionar las membranas del virus y de la célula (86), y el material genético envuelto en una capa protectora de proteína denominada cápside entra a la célula, junto con una transcriptasa reversa, proteasa e integrasa.

Una vez que ya se integró el virus dentro de la célula, se inicia la transcripción de ARNm viral. Posteriormente son traducidas las proteínas virales Gag, Tax y Env necesaria para inducir la proliferación celular y la infección de nuevas células. Preferentemente la transmisión del virus se da de célula a célula, debido a que la infección de células por partículas virales es ineficiente (88) tanto porque se producen muy pocas partículas virales o no se producen estas (109).

La eficiencia de transmisión célula a célula se genera por el contacto directo entre las células mediante el remodelamiento de la matriz extracelular. Para que suceda este remodelamiento en la célula infectada, las proteínas Gag y Env traducidas por

la maquinaria celular se acumulan en el espacio entre la célula infectada y la célula no infectada permitiendo que se genere la sinapsis viral (110). La proteína Tax también contribuye con la sinapsis viral, ya que permite el remodelamiento celular estimulando la polarización de los microtúbulos (111), permitiendo la entrada de proteínas virales y ARN genómico viral a la célula no infectada.

3.13. La respuesta inmune celular frente a HTLV-1

HTLV-1 se mantiene dentro de las células T CD4+, y se propaga por proliferación clonal, y donde los linfocitos T citotóxicos (CTLs) son los que se encargan de la eliminación de las células infectadas. Esta respuesta contra HTLV-1 se genera al ser reconocida la proteína Tax. Las CTLs deberían reducir el nivel de provirus al eliminar las células infectadas (112). Sin embargo, si bien existe una respuesta de las CTLs en estos pacientes, esta no es eficiente debido a que la gran mayoría de infectados por HTLV-1 presenta alta carga proviral.

3.14. La respuesta de anticuerpos frente a Gag, Tax y Env

La respuesta humoral frente a HTLV-1 empieza con una predominante producción de anticuerpos contra la proteína Gag, estos anticuerpos producidos predominan los 2 primeros meses (113); seguidamente, se producen anticuerpos contra la proteína Env de la envoltura nuclear (114) Posteriormente se producen anticuerpos contra la proteína Tax (115). Cabe la posibilidad que se produzca de forma más tardía anticuerpos contra la proteína HBZ, especulación hecha a partir de un estudio que encontró que anticuerpos contra HBZ no correlacionaron con anticuerpos contra Gag, Tax y Env (116).

Es necesario considerar que la generación de anticuerpos frente a estas 3 proteínas es diferente entre las distintas manifestaciones clínicas asociadas a infección por HTLV-1. Por ejemplo, se ha encontrado un patrón diferencial de la respuesta de anticuerpos contra Tax y Env entre Asintomáticos, ATLL y PET (117, 118). Asimismo se ha observado que pacientes con ATLL presentan menores niveles de anticuerpos contra Gag, Tax y Env que pacientes con PET (117, 118).

3.15. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

3.15.1. Alteración de las funciones de los linfocitos T CD4 (+)

Las células blanco más importantes del retrovirus HTLV-1 son los linfocitos T CD4+, los cuales juegan un rol esencial en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Luego de integrarse dentro de la célula como provirus en los linfocitos T CD4+, HTLV-1 induce la proliferación de la célula en la que se encuentra infectando. Se piensa que la proliferación clonal se debe a proteínas virales regulatorias como Tax, el cual actúa como cofactor transcripcional, activando vías de señalización celular relacionadas con la proliferación celular y la anti-apoptosis (48).

Las células ATLL actúan como células T reguladoras lo cual permite suprimir la respuesta inmune en el hospedero (119). HTLV-1 infecta tanto Linfocitos T activados (104) CD4+ CD25+, como Linfocitos T reguladores CD4+ CD25+Foxp3+ (120) lo cual genera la supresión de la respuesta inmune lo que permite que el virus siga expandiéndose, promoviendo la aparición de infecciones oportunistas.

Posteriormente, estas células dejan de expresar Foxp3, debido a la presencia de la proteína Tax (121), por lo que la célula infectada deja de producir Tax para permitir mantener el estado de inmunosupresión. Sin embargo, al dejar de producirse Tax las células T citotóxicas anti-Tax producidas dejan de proliferar y son eliminadas y no se puede eliminar el virus.

El incremento de células T regulatorias suprimen la función de los linfocitos T citotóxicos, lo cual está relacionado al incremento de linfocitos T CD4 efectores que se encuentran infectados. Estos linfocitos migran a los tejidos como sistema nervioso central, pulmones, articulaciones y la úvea (48) y conllevarían a la producción de grandes cantidades de IFN- γ que media la inflamación crónica (65) en estos tejidos.

3.15.2. Infección de células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son consideradas las principales presentadoras de antígenos, estas células pueden ser infectadas por HTLV-1, una CD infectada

puede estimular la proliferación de linfocitos autólogos CD4+ y CD8+ tolerantes a las proteínas de HTLV-1 (48). Además, las CD infectadas permiten la protección del virus y permiten que los virus sean llevados a infectar a la célula blanco, los linfocitos T.

3.15.3. Regulación de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Los linfocitos T CD4+ infectados por HTLV-1 obtienen capacidad regulatoria y que en conjunto con los linfocitos T reguladores suprimen la función de los linfocitos T citotóxicos, al suprimirse la acción de los CTLs estos ya no responden frente al antígeno viral Tax (122).

3.16. Características funcionales de las proteínas Gag, Tax y Env

La proteína Tax de HTLV-1 presenta diferentes funciones que permiten la permanencia del virus, su expansión y evasión del sistema inmune. Promueve la replicación del ADN proviral, daño estructural del ADN del hospedero, la inhibición de la reparación de ADN, la sobreduplicación del centrosoma (123). La proteína Tax además tiene la capacidad de transformar las células y promover oncogénesis tanto en linfocitos T inmaduros como linfocitos T maduros *in vitro* (124). Además se ha descrito que Tax promueve la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas, la represión de p53 (47). También se vincula a Tax con la regulación del ciclo celular, mediante su accionar sobre ciclinas y al inhibir quinasas dependientes de ciclina, promoviendo la proliferación celular (125).

La proteína Env es una glicoproteína transmembrana tipo I que posee 2 subunidades sintetizada como una proteína precursora que luego de traducida es transportada al retículo endoplásmico dónde es modificada post-traduccionalmente con glicosilaciones y oligomerizaciones (126).

Posteriormente pasa a través del aparato de Golgi donde una proteasa celular de la familia de las furinas corta la proteína obteniéndose las 2 subunidades gp46_SU (subunidad de superficie) y gp21_TM (subunidad transmembrana) que forma la envoltura viral. Env es importante para la formación de la sinapsis virológica VS (127) , contribuye con la entrada del virus dentro de la célula, al interactuar con

las proteínas NRP-1, Heparán sulfato y GLUT-1 de la célula hospedera permiten la fusión de las membranas tanto del virus como de la célula hospedera para la transmisión del virus (126).

La proteína Gag es producida como una poliproteína, que presenta modificaciones postraduccionales, en la membrana plasmática mediante la acción de proteasas se generan 3 dominios funcionales p19, p24 y p15. La proteína p15Gag protege el material genético al interactuar con el RNA viral, mientras que p24 forma la cápside que envuelve el virión y p19 forma la matriz que permite la incorporación de las proteínas de la envoltura viral (128).

3.17. Características antigénicas de Gag, Tax y Env

La mayor cantidad de epítopes inmunogénicos han sido localizados en el C-terminal p19gag, en el centro y carboxilo terminal de gp46env, en la región central transmembrana de p21env y en el carboxilo terminal de p40tax. Epítopes similares han sido localizados en la zona amino y central de gp46env, la región central de p21env y el carboxilo terminal de p40tax de HTLV-2.

Epítopes transmembrana HTLV-1 y HTLV-2 de Env, son comúnmente utilizados para detectar anticuerpos para ambos virus, estos epítopes presentan homología entre estos virus lo que genera la presencia de reacción cruzada.

Los kits de diagnóstico utilizados en la detección de infección por HTLV-1, usan fragmentos de las proteínas Gag, Tax y Env, algunos de éstos son los que se indican en la tabla 3.

El uso de la detección de anticuerpos contra la proteína Gag sirve mejor para diferenciar sujetos infectados de no-infectados comparados con los niveles de anticuerpos anti- Env y anti-Tax (116). Asimismo, los niveles de anticuerpos anti-Env se encuentra relacionado directamente con la carga proviral (116).

Tabla 3. Proteínas usadas en el diagnóstico de HTLV-1 (27)

Nombre	Proteína	Posición
Gag1a	Gag	102-117
p24	Gag	1-237
Env1	Env	191-214
Env5	Env	242-252
MTA1	Env	162-209
gd21	Env	361-404
RE3	Env	165-306
Tax8	Tax	106-125
Tax22	Tax	316-335
Tax23	Tax	331-350
Tax24	Tax	336-353

4. Hipótesis

Las variantes de las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env del virus HTLV-1 circulantes en el Perú, tienen un nivel antigénico significativo que permiten el diagnóstico de personas infectadas por HTLV-1.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Evaluar el uso de los extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env en el diagnóstico de HTLV-1.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener secuencias consenso de los genes *gag*, *tax* y *env* a partir de muestras de ADN proviral de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de HTLV-1 y que provienen de diferentes ciudades de nuestro país.
- Producir extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env de HTLV-1.
- Realizar la caracterización diagnóstica de los extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes al enfrentarlas a un panel de sueros por Western Blot.
- Comparar los resultados de Western Blot con los resultados de la prueba de referencia mediante tablas de contingencia.
- Comparar los parámetros de valoración diagnóstica de cada uno de los extractos que contienen las proteínas recombinantes a partir del cálculo de la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo obtenidos a partir de las tablas de contingencia.

6. Materiales y métodos

6.1. Determinación de las secuencias consenso

La determinación de las secuencias consenso de cada uno de los genes *gag*, *tax* y *env* se realizó con el propósito de establecer por cada gen una secuencia que resuma la diversidad de cada uno de estos para realizar los ensayos de clonamiento posteriores.

6.1.1. Muestras

Se seleccionaron 143 muestras de ADN de pacientes con HTLV-1 confirmado, los cuales brindaron su consentimiento informado para el uso futuro de sus muestras, provenientes del estudio “*Host genetic, immune and viral factors in diseases expression of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 in Perú*” (número SIDISI: 51298), el cual siguió los lineamientos éticos de la Guía Internacional para Investigación Biomédica Involucrando Sujetos Humanos propuesto por el Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

Criterios de inclusión

Las muestras tienen prueba confirmatoria para HTLV-1, provienen de diferentes lugares de nacimiento (ver figura 11) y procedencia (ver figura 12), presentan una o dos condiciones clínicas relacionadas a la infección por HTLV-1; siendo éstos portadores asintomáticos, pacientes PET, ATLL o coinfectados con VIH, SS, TB o Dermatitis infecciosa (ver tabla 4).

Criterios de exclusión

Todos aquellos casos donde los pacientes presentaron relación familiar consanguínea (padre-hijo) o no-consanguínea (esposo-esposa) solo se incluyó a uno de ellos para evitar la redundancia de genotipos virales.

Tabla 4. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes *tax*, *gag* y *env* según manifestación clínica

Cantidad de muestras por Manifestación Clínica	
Asintomático	61
Estrongiliodiasis	14
Estrongiliodiasis y acarosis	4
Estrongiliodiasis y herpes zóster	3
Estrongiliodiasis y Tuberculosis	1
PET	46
PET y estrongiloidiasis	4
ATLL	5
ATLL y acarosis	4
ATLL y herpes zóster	1
Micosis fungoides	1



Cantidad de muestras por lugar de nacimiento			
Amazonas	2	Junín	8
Ancash	12	La Libertad	3
Apurímac	16	Lambayeque	6
Arequipa	4	Lima	35
Ayacucho	18	Loreto	2
Cajamarca	3	Pasco	2
Callao	4	Piura	3
Cuzco	9	Puno	1
Huancavelica	3	San Martín	2
Huánuco	4	Ucayali	2
Ica	7		

Figura 11. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes *Tax*, *Gag* y *Env* según el lugar de Nacimiento



Cantidad de muestras por lugar de nacimiento			
Ancash	1	Ica	5
Apurímac	1	Junín	2
Ayacucho	6	Lima	115
Callao	5	Pasco	1
Cuzco	4	Tacna	1
Huánuco	3	Ucayali	2

Figura 12. Características de las muestras para la construcción de la secuencia consenso de los genes Tax, Gag y Env según el lugar de procedencia

6.1.2. Amplificación proviral de los genes *gag*, *tax* y *env*

La amplificación por PCR de cada uno de los genes se realizó en fragmentos que sobrelapan entre sí. En el caso de *gag* y *env* la amplificación fue realizada en 3 fragmentos (A, B y C) y en el caso de *tax* en 2 fragmentos (A y B) (ver figura 13).

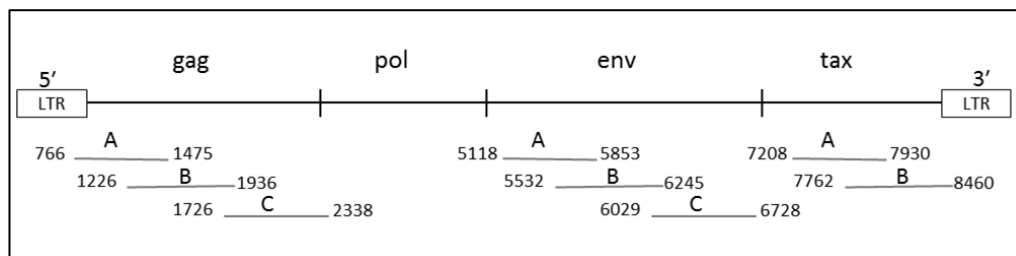


Figura 13. Ubicación de los cebadores (*primers*) para la amplificación de los genes *gag*, *env* y *tax*

El protocolo de la reacción de amplificación por PCR por cada fragmento se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración final de los reactivos a usar en la reacción de amplificación de los genes *gag*, *tax* y *env*.

Gen	<i>gag</i>			<i>tax</i>		<i>env</i>		
	A	B	C	A	B	A	B	C
Fragmento	A	B	C	A	B	A	B	C
Buffer 10x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ (mM)	1.5	1.3	1.3	1.5	1.5	1.5	1.3	1.3
dNTPs (μM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Primer F (μM)	1.2	1.8	1.8	1.8	1.8	1.5	1.5	1.5
Primer R (μM)	1.2	1.8	1.8	1.8	1.8	1.5	1.5	1.5
Taq Polimerasa (U/μL)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
ADN (ng)	60	60	60	60	60	60	60	60

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 25μL en un Termociclador *Veriti (Applied Biosystems)*. El protocolo de ciclaje por cada fragmento se detalla en la tabla 6.

Tabla 6. Protocolo de ciclaje para la amplificación de los genes *tax*, *env* y *gag*

<i>tax</i> -Fragmento A			<i>tax</i> -Fragmento B			<i>env</i> -Fragmento A/ <i>gag</i> -Fragmento C		
1 ciclo	94°C	2min	1 ciclo	94°C	2min	1 ciclo	94°C	2min
	94°C	30s		94°C	30s		94°C	45s
30 ciclos	67°C	45s	30 ciclos	63°C	45s	40 ciclos	65°C	45s
	72°C	30s		72°C	30s		72°C	30s
1 ciclo	72°C	5min	1 ciclo	72°C	5min	1 ciclo	72°C	5min

<i>env</i> -Fragmento A			<i>env</i> -Fragmento C			<i>gag</i> -Fragmentos A y B		
1 ciclo	94°C	2min	1 ciclo	94°C	2min	1 ciclo	94°C	2min
	94°C	30s		94°C	30s		94°C	30s
10 ciclos	67.5°C	45s	10 ciclos	65°C	45s	10 ciclos	57°C	30s
	72°C	30s		72°C	30s		72°C	30s
	94°C	30s		94°C	30s		94°C	30s
20 ciclos	63°C	45s	20 ciclos	63°C	45s	20 ciclos	64°C	30s
	72°C	30s		72°C	30s		72°C	30s
1 ciclo	72°C	5min	1 ciclo	72°C	5min	1 ciclo	72°C	5min

6.1.3. Secuenciamiento de los genes *gag*, *tax* y *env*

Los productos de amplificación obtenidos de cada fragmento por cada gen de cada una de las 143 muestras fueron secuenciados por Macrogen (*Baltimore, MD*). Los

cromatogramas obtenidos fueron analizados y editados mediante el programa *Bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Posteriormente, los fragmentos fueron ensamblados haciendo uso del programa *Codon Code Aligner* (<http://www.codoncode.com/aligner/>) usando la cepa de referencia ATK (*Accession number*: J02029.1).

6.1.4. Obtención de secuencia consenso y análisis filogenético

La determinación de las secuencias consenso de cada uno de los genes *gag*, *tax* y *env* se realizó por alineamiento múltiple por CLUSTAL W dentro de la plataforma del programa Mega 5.2 (<http://www.megasoftware.net/>) de cada una de las muestras secuenciadas por cada gen usando el método de *Maximum Likelihood* y el modelo de evolución de *Tamura-Nei* (129).

Con el objetivo de obtener información sobre la diversidad de estos genes en nuestro país se realizó la construcción de árboles filogenéticos, haciendo uso de la información del alineamiento múltiple realizado en la sección 6.1.4 se realizó un segundo alineamiento múltiple usando como *outgroup* cepas HTLV1b, HTLV1c, HTLV1d y como *ingroup* cepas de HTLV1a asiáticas y sudamericanas (ver tabla 7).

El modelo de evolución molecular utilizado fue de *Tamura-Nei* (129), el cual considera el sesgo en la cantidad de G+C y las diferencias entre la proporción de transversiones y transiciones en una tasa calculada como 3 (129). El árbol fue construido mediante el método *Maximum Likelihood* (*Log likelihood*= -21375.2638), siendo el agrupamiento realizado con un *bootstrap* de 2000 replicaciones.

Considerando la hipótesis del reloj molecular, teniendo en cuenta la tasa evolutiva de HTLV-1 de 6.8×10^{-7} (130) se recalculó el tamaño de las ramas del árbol.

Tabla 7. Cepas de referencia usadas en la construcción de los árboles filogenéticos

Cepas de referencia para el análisis filogenético					
Cepa	Origen geográfico	Manifestación clínica	Accesion number	Grupo	Característica en árbol
MT-2	Japón	ATLL	M37747.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
ATK	Japón	ATLL	J02029.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
ATLL-YS	Japón	ATLL	U19949.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
BOI	Francia	TSP	L36905.1	Cosmopolita-C	<i>Ingroup</i>
CH	América del Norte	ATLL	M67490.1	Cosmopolita-E	<i>Ingroup</i>
Co-005	Colombia	TSP	AF405342.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
Co-006	Colombia	TSP	AF405343.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
Co-007	Colombia	TSP	AF405344.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
Co-009	Colombia	TSP	AF405346.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
EL	Zaire	ATLL	M67514.1	África Central-D	<i>Outgroup</i>
H5	Japón	ATLL	M37301.1	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>
H990	Romania	ATLL	U81862.1	Cosmopolita-E	<i>Ingroup</i>
IP60-A	Guyana Francesa	ATLL	AY604934.1	Maroni	<i>Ingroup</i>
Mel-5	Melanesia	AC	L02534.1	Melanesia	<i>Outgroup</i>
MSHR-1	Australia	AC	M92818.1	Melanesia	<i>Outgroup</i>
PAR	Irán	TSP	AY604935.1	Cosmopolita-B	<i>Ingroup</i>
pt1	Indias Este	ATLL	U81864.1	Cosmopolita-E	<i>Ingroup</i>
pt3	Brasil	ATLL	U81866.1	Cosmopolita-D	<i>Ingroup</i>
pt5	Brasil	ATLL	U81867.1	Cosmopolita-D	<i>Ingroup</i>
pt9	Brasil	ATLL	U81869.1	Cosmopolita-D	<i>Ingroup</i>
pt12	Brasil	ATLL	U81865.1	Cosmopolita-F	<i>Ingroup</i>
2036-A	Guyana Francesa	Linfoma	AY604874.1	Maroni	<i>Ingroup</i>
2303	Gabón	AC	AY604895.1	Cosmopolita-C	<i>Ingroup</i>
2059	Guyana Francesa	TSP	AY604880.1	Cosmopolita-F	<i>Ingroup</i>
2922	Gabón	AC	AY604931	África Central-A	<i>Outgroup</i>
2306	Gabón	AC	AY604896	África Central-A	<i>Outgroup</i>
Aus-NR	Australia		JX891479.1	HTLV-1c	<i>Outgroup</i>
	África Central		JX507077.1	HTLV-1b	<i>Outgroup</i>
RKI3-Ge	Alemania	ATLL	AF042071	Cosmopolita-A	<i>Ingroup</i>

6.2. Obtención de plásmidos recombinantes

Se obtuvo 7 plásmidos clonados con ADN sintético de la empresa Genscript® (<http://www.genscript.com/>) conteniendo las secuencias consenso (obtenidas según la sección 6.1.4) de *gag*, *tax* y *env* y fragmentos de las secuencias de los genes *gag* (1 fragmento), *env* (2 fragmentos) y *tax* (1 fragmento) (ver tabla 8).

Los genes y fragmentos de la secuencia de *gag* (correspondientes a las proteínas rGag429, rGag270) y de *env* (correspondientes a las proteínas rEnv488, rEnv1 y rEnv2) (ver tabla 8) fueron clonados en pET22b (+). Mientras que el gen y fragmento de la secuencia del gen *tax* (correspondientes con las proteínas rTax353 y rTax153) fueron clonados en pET15b (+).

Tabla 8. Características de las proteínas recombinantes

Proteína	Tipo	Tamaño	Peso molecular
rGag429	Proteína completa	428aa	53kDa
rGag270	Fragmento	178aa	22kDa
rEnv488	Proteína completa	487aa	54kDa
rEnv1	Fragmento	197aa	23kDa
rEnv2	Fragmento	121aa	13kDa
rTax353	Proteína completa	352aa	39kDa
rTax153	Fragmento	153aa	17kDa

6.3. Expresión de proteínas recombinantes

6.3.1. Expresión de las proteínas recombinantes rGag270 y rGag429, rTax153 y rTax353

Los plásmidos recombinantes correspondientes a las proteínas rGag429, rGag270, rEnv488, rTax353 y rTax153 fueron introducidos por Shock Térmico (131) en *E. coli* Rosetta (DE3). Las células *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas fueron cultivadas en 75mL de medio LB (1% p/v de Triptona, 0.5% p/v de extracto de levadura y 0.5% p/v de NaCl) con 50µg/mL de Carbenicilina y 30µg/mL de Cloranfenicol (LB/CB/CL) a 37°C por 18 horas. Posteriormente, 50 mL de cultivo

fueron utilizados para inocular 500mL de medio LB/CB/CL que fue incubado a 37°C hasta alcanzar un OD de 0.6. Una vez alcanzado el OD deseado se indujo la expresión de cada una de las proteínas con 1mM IPTG durante 4 horas a 22°C. En el caso de rGag270 para comparar si existe diferencia en el tiempo de inducción de la expresión, se indujo la expresión de rGag270 durante 5 y 20 horas.

6.3.2. Expresión de la proteína recombinante rEnv1

El plásmido correspondiente con la proteína rEnv1 fue introducido en *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3) y *E. coli* Lemo 21(DE3).

En el caso de las células *E. coli* BL21(DE3) _rEnv1 fueron cultivadas en 10mL de medio LB/CB a 37°C por 18 horas. Posteriormente se tomó 5mL de cultivo y se inoculó 50mL de medio LB/CB hasta alcanzar un OD de 0.6. Después de alcanzado el OD se indujo la expresión de rEnv1 con 1mM IPTG durante 4 horas a 30°C.

Mientras que en el caso de las células *E. coli* Rosetta (DE3) _rEnv1 fueron cultivadas en 10mL de medio LB/CB/CL a 37°C por 18 horas, se tomó 5 mL del cultivo y se inoculó 50mL de medio LB/CB/CL se incubó a 37°C hasta alcanzar un OD de 0.6 y se indujo la expresión de rEnv1 con 1mM de IPTG durante 4 horas a 30°C.

Las células *E. coli* Lemo 21(DE3) _rEnv1 fueron cultivadas en 75mL de medio LB/CB/CL por 18 horas a 37°C en agitación. Se tomó 50mL del cultivo y se inoculó en 500mL de LB/CB/CL con 50µM de Ramnosa hasta alcanzar un OD de 0.8. Posteriormente, se indujo la expresión de rEnv1 con 400µM de IPTG durante 7 horas a 22°C. Se usaron distintas concentraciones de Ramnosa (50µM, 100µM, 200µM, 500µM, 750µM, 1000µM y 2000µM) en el medio de cultivo para determinar la concentración adecuada de Ramnosa a usar en el medio de cultivo para mejorar la producción de la proteína recombinante rEnv1.

6.3.3. Expresión de las proteínas recombinantes rEnv2 y rEnv488

En el caso de los plásmidos recombinantes correspondientes a las proteínas rEnv488 y rEnv2 fueron introducidos por Shock Térmico (131) en *E. coli* Lemo 21(DE3), las células transformadas fueron cultivadas en LB/CB/CL por 18 horas a

37°C. Se tomó 50 mL del cultivo y se inoculó a un cultivo de 500mL, el cual se incubó a 37°C hasta que el crecimiento de las células alcanzó un OD de 0.9. Luego se realizó la expresión de las proteínas rEnv2 y rEnv488 con 500µM de IPTG durante 6 horas a 22°C.

6.3.4. Purificación de proteína recombinantes por cromatografía de afinidad a níquel

Los cultivos inducidos fueron centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 20mL de buffer de lisis pH 8.0 (0.2M de Bicarbonato de Sodio, 0.5M de NaCl, 1mg/mL de Lisozima y 0.1% de Tween) y fue sometido a 6 ciclos de sonicación de 1 minuto (30 segundos sonicando seguido de 30 segundos sin sonicar) a 40% de amplitud. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó usando el kit *Protein minipreps of 6xHis-tagged proteins* (132) mezclando el sobrenadante obtenido de la sonicación con la resina de agarosa con Ácido Nitrilotriacético-Níquel (Ni-NTA) en una dilución 1:100 y fue incubada a 4°C por 30 minutos. La mezcla se adicionó a la columna del kit y se realizaron 2 lavados con Buffer de lavado (0.2M de Bicarbonato de Sodio, 0.5M de NaCl, 0.1% de Tween y 20mM de Imidazol). Se eluyó la proteína con Buffer de elución (0.2M de Bicarbonato de Sodio, 0.5M de NaCl, 0.1% de Tween y 250mM de Imidazol) (132).

6.3.5. Separación de proteínas expresadas por SDS-PAGE

Se tomó 20µL del sobrenadante obtenido según la sección 6.3.4 y fue mezclado con 20µL de buffer Laemmli 2X (65.9mM de Tris-HCl, 26.3% p/v de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de 2-mercaptoetanol). La mezcla se hizo hervir a 95°C y fue separada por *SDS-PAGE* al 15% (1.5mM de Tris-HCl pH 8.8, 10% de Persulfato de Amonio, 1% de TEMED y Acrilamida/Bisacrilamida 29:1) a 100mA, 5V por 90 minutos.

6.3.6. Transferencia de proteínas en membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas en SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia en medio húmedo a 4°C por 1 hora a 100mA y 5V usando buffer Towbin de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% v/v de Etanol) (133).

6.3.7. Ensayos de Western Blot con proteínas expresadas

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas fueron lavadas 2 veces con Buffer Tris Salino 1X (TBS) (0.2 M de Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M de NaCl) 1x, luego se realizó 1 lavado con TBS 1x con 0.05% de Tween-20 (TTBS). El bloqueo fue realizado con 5% de leche descremada en TTBS (TTBS-BLOTTO) durante 2 horas a Temperatura ambiente en agitación y fueron lavadas con TTBS.

Tabla 9. Anticuerpos Monoclonales usados en el Western Blot

Proteína/ péptidos	Tipo	Anticuerpo monoclonal
rGag429	Proteína completa	HTLV-1 p19 Anticuerpo (TP-7)
rGag270	Fragmento	HTLV-1 p19 Anticuerpo (TP-7)
rTax353	Proteína completa	HTLV-1 Tax Anticuerpo (vC-12)
rTax153	Fragmento	HTLV-1 Tax Anticuerpo (vC-12)
rEnv488	Proteína completa	HTLV-1 gp46 Anticuerpo (1C11)
rEnv1	Fragmento	HTLV-1 gp46 Anticuerpo (1C11)
rEnv2	Fragmento	HTLV-1 gp21 Anticuerpo (vS-20)

Posteriormente se incubó por 1 hora con 10mL de anticuerpo específico para cada proteína (ver tabla 9) preparados en TTBS-BLOTTO, luego se realizó 3 lavados con TTBS. Seguidamente, se incubó por 1 hora con Anti-IgG Humano-HRP (Sigma Aldrich, código: A8792) en una dilución 1:5000 en TTBS-BLOTTO. Luego se realizó el lavado de las membranas con TBS, se reveló con 50mg/mL DAB (SIGMAFAST™ DAB) y se detuvo la reacción con agua destilada.

6.4. Caracterización diagnóstica de los extractos que contienen las proteínas recombinantes producida

6.4.1. Panel de sueros

Las muestras que conforman el panel de sueros fueron distribuidas en 2 grupos, muestras HTLV-1 positivas al ELISA y PCR y muestras HTLV-1 negativas al ELISA y PCR. Las muestras HTLV-1 positivas provienen de la cohorte de seguimiento de HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, proveniente de un estudio anterior: Infección por HTLV-1-Cohorte de seguimiento clínico (código SIDISI: 01483) y cuentan con consentimiento Informado para estudios posteriores.

Con el uso de estas muestras se realizó el análisis antigénico de los fragmentos de proteínas que se producirán. Los resultados obtenidos serán comparados con la prueba de Referencia de PCR y ELISA para HTLV-1.

Al ser un estudio exploratorio- fase I en Pruebas de Diagnóstico, la cantidad de muestras puede variar entre 50-100 muestras (134). El panel de sueros usados, se compuso de 56 muestras; de las cuales 25 fueron muestras negativas tanto al ELISA como al PCR para HTLV-1 (ver tabla 10) y 31 fueron muestras positivas tanto al ELISA como al PCR a HTLV-1, entre las cuales tenemos 12 Asintomáticos, 4 con ATLL, 8 con PET y 7 con Estrongiloidiasis (ver tabla 10).

Tabla 10. Muestras usadas en los ensayos de Western Blot

Características de las muestras usadas en los ensayos de Western Blot		
HTLV-1 positivas	Asintomáticos	12
	ATLL	4
	PET	8
	Estrongiloidiasis	7
HTLV-1 negativas	HIV	20
	Sanos	5

6.4.2. Western Blot de los extractos que contienen las proteínas recombinantes Gag, Tax y Env enfrentadas al panel de sueros

Se produjeron las proteínas rTax153, rGag270, rGag429 (ver sección 6.3.1), rEnv1 (ver sección 6.3.2) y rEnv2 (ver sección 6.3.3), fueron separadas por SDS-PAGE (ver sección 6.3.5) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (ver sección 6.3.6).

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas fueron cortadas en tiras individuales y fueron dispuestas cada tira en canaletas y se realizó el Western Blot tal como se ha descrito en la sección 6.3.7, utilizando el panel de sueros (tabla 10 sección 6.4.1), siendo cada uno de los sueros usados en una dilución 1/100 en TTBS-BLOTTO.

6.5. Análisis estadístico

6.5.1. Medición de parámetros de valoración diagnóstica

Después de obtenidos los resultados de Western Blot de cada una de las proteínas, los resultados se compararon con la prueba de referencia mediante tablas de contingencia. La prueba de referencia fue el Biokit-HTLVI+II ELISA y PCR diagnóstico para HTLV-1.

Para la construcción de las tablas de contingencia, se usaron tablas de 2x2, se consideró colocar el resultado de cada extracto que contiene cada una de las proteínas recombinantes en el lado izquierdo de la tabla de contingencia y al lado superior derecho los resultados de la prueba de referencia.

Las tablas de contingencia fueron construidas como se muestra a continuación:

Extractos conteniendo una determinada proteína recombinante	Prueba de referencia (HTLV-I/II ELISA)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
	a+c	b+d	n

Con la información contenida en las tablas de contingencia se determinaron los parámetros de valoración diagnóstica, Sensibilidad y Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo.

El cálculo de cada uno se realizó como se muestra a continuación:

$$\text{Sensibilidad estimada (S)} \quad S = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Error Estándar Sensibilidad (EES)} \quad EES = \sqrt{\frac{S(1-S)}{a+c}}$$

$$\text{Intervalo de confianza de la Sensibilidad calculada IC95\% (S)} \quad IC95\%(S) = S \pm (1.96 \times EES)$$

$$\text{Especificidad estimada (E)} \quad E = \frac{d}{b+d}$$

Error Estándar
Especificidad (EEE)

$$EEE = \sqrt{\frac{E(1-E)}{b+d}}$$

Intervalo de confianza de
la Especificidad calculada
IC95% (E)

$$IC95\%(E) = E \pm (1.96 \times EEE)$$

La sensibilidad es la probabilidad de que un individuo enfermo tenga un resultado positivo; en tal sentido la Sensibilidad estaría mostrando el porcentaje de individuos enfermos correctamente diagnosticados (134). Cuanto más alto sea el resultado de sensibilidad de una proteína es más probable que pueda detectar a individuos infectados por HTLV-1; una alta sensibilidad representaría un bajo número de falsos negativos.

En el caso de la Especificidad es la probabilidad de que un individuo sano tenga un resultado negativo (134); es decir muestra el porcentaje de resultados negativos en aquellos individuos que no estarían infectados por HTLV-1. Una alta especificidad indicaría un bajo número de falsos positivos.

Otros parámetros de valoración diagnóstica calculados fueron el Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN).

El cálculo de VPP y VPN se realizó de la siguiente manera:

Valor predictivo positivo
(VPP)

$$VPP = \frac{a}{a+b}$$

Intervalo de confianza de
VPP
IC95% (VPP)

$$IC95\%(VPP) = VPP \pm 1.96 \sqrt{\frac{VPP(1-VPP)}{a+b}}$$

Valor predictivo negativo
(VPN)

$$VPN = \frac{d}{c+d}$$

Intervalo de confianza de

$$\begin{array}{l} \text{VPP} \\ \text{IC95\% (VPN)} \end{array} \quad \text{IC95\%(VPN)} = \text{VPN} \pm 1.96 \sqrt{\frac{\text{VPN}(1 - \text{VPN})}{c + d}}$$

El VPP es la probabilidad de que una prueba positiva correspondería a un verdadero enfermo, es así que el VPP estaría representando el porcentaje de individuos enfermos entre todos los individuos con resultado positivo (134). Mientras que en el caso del VPN es la probabilidad de que una prueba negativa diagnostique correctamente a un individuo sano (134).

6.5.2. Comparación de los extractos que contienen las proteínas

recombinantes mediante análisis de áreas bajo las curvas ROC

Se construyeron curvas ROC por cada proteína según el método Hsieh & Turnbull (135). Mientras que el cálculo del área bajo las curvas ROC se realizó mediante la suma de rangos de Wilcoxon.

Se comparó cada una de las proteínas, mediante el análisis de las áreas bajo las curvas ROC (ABC = Área Bajo la Curva) y se analizó la distribución asintótica de cada una de las curvas. Se consideró que aquella proteína que posea un valor mayor de ABC tiene mayor probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos seleccionado al azar como sano o enfermo. La significancia de la comparación entre las curvas se analizó mediante el uso de la prueba de Hanley y McNeil (136) que usa una distribución Chi cuadrado, este cálculo se realizó usando la plataforma de STATA v. 12.0.

Tabla 11. Categorías TAPC según el área bajo la curva ROC.

Categorías TAPC según el área bajo la curva ROC(ABC)	
ABC	Categoría
0.9-1.0	Excelente
0.8-0.9	Muy bueno
0.7-0.8	Bueno
0.6-0.7	Pobre
0.5-0.6	Malo

Los valores del cálculo del ABC obtenidos por cada proteína nos permiten valorar la exactitud y valor diagnóstico de cada proteína, mediante el uso del TAPC (de sus siglas en inglés *traditional academic point system*). El TAPC categoriza y clasifica los valores del ABC que van de 0-1 (137). Las categorías del TAPC según los valores de ABC se muestran en la tabla 11.

7. Resultados

7.1.1. Determinación de las secuencias consenso de los genes *gag*, *tax* y *env*

Mediante un alineamiento múltiple de las secuencias amplificadas por PCR a partir de ADN proviral se determinó las secuencias consenso por cada gen. Las muestras de ADN provinieron de individuos pertenecientes a la cohorte de Estudio de HTLV-1 del IMTAvH. Ninguna de estas muestras presentó relación consanguínea (padre - hijo) y no-consanguínea familiar (esposo - esposa). Además, las muestras procedían de distintos lugares de nacimiento y procedencia de nuestro país y poseen diferentes manifestaciones clínicas.

En el caso de la obtención de la secuencia consenso de *gag*, se amplificó en 3 fragmentos el gen en las 143 muestras seleccionadas; al ensamblar los 3 fragmentos por cada muestra, 53 no presentaban la secuencia completa de *gag*, por lo que la secuencia consenso del gen *gag* fue construida por el alineamiento múltiple de 90 contigs ensamblados.

Para la determinación de la secuencia consenso de *tax*, se amplificó el gen en 2 fragmentos en 143 muestras y se realizó el análisis bioinformático para ensamblar los 2 fragmentos obtenidos por cada muestra. Sin embargo, 13 muestras no estaban completas por lo que la secuencia consenso *de tax* fue determinada por el alineamiento múltiple de 130 contigs ensamblados.

Mientras que en el caso de la secuencia consenso de *env*, se amplificó en 3 fragmentos, que después del análisis bioinformático fue ensamblado en contigs, de los cuales 65 no estaban completos por lo que la secuencia consenso fue construida por el alineamiento múltiple de 78 contigs ensamblados.

La secuencia consenso por cada gen se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Secuencias consenso de los genes *tax*, *gag* y *env*

Gen	Secuencia consenso
<i>gag</i>	<p>ATGGGCCAAATCTTTCCCGTAGCGCTAGCCCTATTCCGCGGCCGCCCGGGGGCTGGCCGCTCATCACTGGC TTAACTTCTCCAAGCGGCATATCGCCTAGAACCCGGTCCCTCCAGTTACGATTTCCACCAGTTAAAAAATT TCTTAAATAGCTTTAGAAACACCGGTCTGGATCTGTCCCATTAACACTCCCTCCTAGCCAGCCTACTCCCAA AAGGATACCCCGGCCGGTGAATGAAATTTACACATACTCATCCAAACCCAAGCCAGATCCCGTCCCGTCC CGCGCCACCGCCGCTCATCCCCACCCACGACCCCGGATCTGATCCACAAAATCCCCCTCCCTATGTT GAGCCTACGGCCCCCAAGTCCTTCCAGTCATGCACCCACATGGTGGCCCTCCAAACCATCGCCATGGCAAA TGAAAGACCTACAGGCCATTAAGCAAGAAGTCTCCCAAGCAGCCCTGGGAGCCCCAGTTTATGCAGACCA TCCGGCTTGGGTGCAGCAGTTGACCCCACTGCCAAAGACCTCCAAGACCTCTGCAGTACCTTTGCTCCTC CCTCGTGGCTTCCCTCCATCACCAGCAGTAGATAGCCTTATATCAGAGGCCGAAACCCGAGGTATTACAGGT TATAACCCCTTAGCCGGTCCCTCCGTGTCCAAGCCAACAATCCACAACAACAAGGATTAAGGCGAGAATAC CAGCAACTCTGGCTCGCCGCTTCCGCGCCCTGCCAGGGAGTGCCAAAGACCTTCTGGGCCCTTATCCTCC AAGGCCTGGAGGAGCCTTACCACGCTTCTGTAGAACGCCTCAACATAGCTCTTGACAATGGGGTGCAGAAAG GCACGCCAAAGACCCATCTTACGTTCTTACGCTACTCCAATGCAAAACAAGAATGCCAAAAATTACTACA GGCCCGAGGACACACTAATAGCCCTCTAGGAGATATGTTGCGGGCTTGTACAGACTGGACCCCAAGACAA AACCAAAGTGTAGTTGTCAGCCTAAAAACCCCCCAAATCAGCCGTGCTTCCGGTGGGGAAAGCAGG CCACTGGAGTCGGGACTGCACTCAGCCTGTCCCCCCCCGGGCCATGCCCTATGTCAAGACCCAACTCAC TGAAGCGAGACTGCCCGCCTAAAGCCACTATCCAGAACCAGAGCCAGAGGAAGATGCCCTCTATTA GACCTCCCGTGACATCCACACCCAAAAAACTCCATAGGGGGGAGGTTAAAAACTCCATAGGGGGGA GGTTAA</p>
<i>tax</i>	<p>ATGGCCACTTCCCAGGTTTGGACAGAGTCTTCTTTTCGGATACCCAGTCTACGTGTTTGGAGACTGTGTACA AGGCGATTGGTGCCCATCTCTGGGGGACTATGTTCCGGCCGCTACATCGTCACGCCCTACTGGCCACCTGT CCAGAGCATCAGATCACCTGGGACCCCATCGATGGACGCGTTATCGGCTCAGCTCTACAGTTCTTATCCCTC GACTCCCTCCTTCCCCACCCAGAGAACCTTAAGACCCCAAGGTCCTTACCCCGCAATCACTCATAACAAC CCCAACATTCCACCCTCCTTCCCTCAGGCCATGCGCAAATATCCCCCTTCCGAAATGGATACATGGAACCC ACCCTTGGGACAGCCTCCCAACCCTGTCTTTCCAGACCCCGGACTCCGGCCCCAAAACCTGTACACCCTCT GGGAGGCTCCGTTGTCTGCATGTACCTTACCAGCTTTCCCCCCATCACCTGGCCCTCCTGCCCCACGG ATTTTTTGCACCCCGCCAGCTCGGAGCCTTCTCACC AATGTTCCCTACAAGCGAATAGAAGAACTCCTCT ATAAAATCTCCCTTACCACAGGGGCCCTAATAATTCTACCGAAGACTGTTTGGCCACCACCTTTTCCAGCCT GTTAGGGACCCCGTACGCTAACAGCCTGGCAAAACGGCCTCCTTCCGTTCCACTCAACCCTCACCCTCCAG GCCTTATTTGGACATTTACCGATGGCAGCCTATGATTTCCGGCCCTGCCCTAAAGATGGCCAGCCATTTTA TACTACAGTCTCCTCTTATATTTCAAAAATTTCAAACCAAGCCCTACCACCCCTATTCTACTCTACA CGGCTCATAAGTACTCTTCTTTTATAATTTACATCTCCTGTTTGAAGAATACACCAACATCCCCATTTCTC TACTTTTAAACGAAAAAGAGGCAGATGACAATGACCATGAGCCCAAATATCCCCCGGGGGCTTAGAGCCTC CCAGTGA AAAACATTTCCGCGAAACAGAAGTCTGA</p>
<i>env</i>	<p>ATGGGTAAGTTTCTCGCCACTTTGATTTTATTCTTCCAGTTCTGCCCTCATCCTCGGTGATTACAGCCCCAG CTGCTGACTCTACAATTGGAGTCTCTCATACCCTTAAACCTGC AATCCTGCCAGCCAGTTTGTTCGT GGACCCTCGACCTGCTGGCCCTTTCAGCAGATCAGGCCCTACAGCCCCCTGCCCTAATCTAGTAAGTTACTC TAGCTACCATGCCACCTATTCCCTATATCTATTCCCTCATTGGATTA AAAAGCCAAACCGAAATGGCGGAGGC TATTATTAGCCTCTTATTACAGACCTTGTCTTAAAGTGCCATACCTGGGGTGCCAAATCATGGACCTGGCC CTATACAGGAGCCGTCTCCAGCCCTACTGGAAGTTTACGCAAGATGTCAATTTACTCAAGAAGTGTACGC CTCAATATTAATCTCCATTTTTCGAAATGCGGTTTCCCTTCTCCCTTCTAGTCGACGCTCCAGGATATGACC CATCTGGTTCCTCAATACCGAACCCAGCCAACTGCCTCCACCCGCCCTCCTTACTCCCCACTCTAACCTAG ACCACATCTCGAGCCCTATACCATGGAAATCAAAACTCCTGACCTTGTCCAGTTAAACCTACAAAAGCAC TAATTACTTTGATTTGTCTGTATCGATCGTGCCAGCCTATCCACTTGGCAGCTCTATACTCTCCAACGTCT CTGTTCCATCTCTTCTTCTACCCCTCCTTACCCTATCGTTAGCGCTTCCAGCCCCCCTGACGTTACCAT TTAACTGGACCCACTGCTTTGACCCCAAGATTCAAGCTATAGTCTCTCCCTGTCTATAACTCCCTCATCTG CCCCCTTTTCTTGTACCTGTTCCACCCCTGGGATCCCGCTCCCGCCGAGCGGTACCGGTGGCGGTCTGGCT TGTCTCCGCCCTGGCCATGGGAGCCGAGTGGCTGGCGGGATTACCGGCTCCATGTCCCTCGCCTCAGGAAAG AGCCTCTACATGAGGTGGACAAAGATATTTCCCAATTAACCTCAAGCAATAGTCAAAAACCAAAAATCTA CTCAAAATGCGCAGTATGCTGCCAGAACAGACGAGGCCTTGATCTCTGTTCTGGGAGCAAGGAGGATTAT GCAAAGCATTACAAGAAGAGTGTGTTTCTAAATATTACTAATTTCCATGTCTCAATACTACAAGAAAGACC CCCCCTTGAGAAATCGAGTCTGACTGGCTGGGGCCTTAACTGGGACCTTGGCCTCTACAGTGGGCTCGAGAG GCCTTACAAACTGGAATCACCTTGTGCGGCTACTCTTCTGTTATCCTTGCAGGACCATGCATCTCCGTCA GCTACGACACCTCCCCTCGCGGTGACACACCCCATTACTCTTATAAACCTGAGTCATCCCTGTAA</p>

7.1.2. Análisis de la distribución filogenética de los genes *gag*, *tax* y *env*

Se utilizó la información obtenida del alineamiento múltiple para 1) realizar árboles filogenéticos, 2) obtener información de las cepas circulantes en nuestro país, 3) observar diferencias en las secuencias de los genes *gag*, *tax* y *env* entre diferentes lugares de nacimiento y lugares de procedencia, y 4) comparar la existencia de algún patrón entre la secuencia genómica viral y el desarrollo de una determinada manifestación clínica.

Al analizar los árboles filogenéticos, observamos que, en el caso de *gag*, el gen se encuentra conservado en nuestro país, la secuencia de *gag* presentó un porcentaje de identidad del 99.3%. No se encontró patrones de asociación entre las secuencias de nucleótidos y lugares de nacimiento, procedencia o manifestaciones clínicas (ver figura 14).

En el caso de *tax*, el gen se encuentra conservado en nuestro país, la secuencia de *tax* presentó un porcentaje de identidad del 98.8%. Además, no se encontró patrones de asociación entre las secuencias de nucleótidos y lugares de nacimiento, procedencia o manifestaciones clínicas (ver figura 15).

En el caso de *env*, observamos que una sola muestra agrupa con HTLV-1b y el resto agrupa con HTLV-1a Cosmopolita, dentro de este grupo observamos que 2 muestras agrupan con secuencias del Caribe, 3 muestras agrupan con secuencias japonesas, 4 agrupan con muestras de Brasil, una secuencia con muestras de Colombia y el resto de secuencias peruanas agrupan juntas. El porcentaje de identidad de éstas últimas es de 95.21% (ver figura 16).

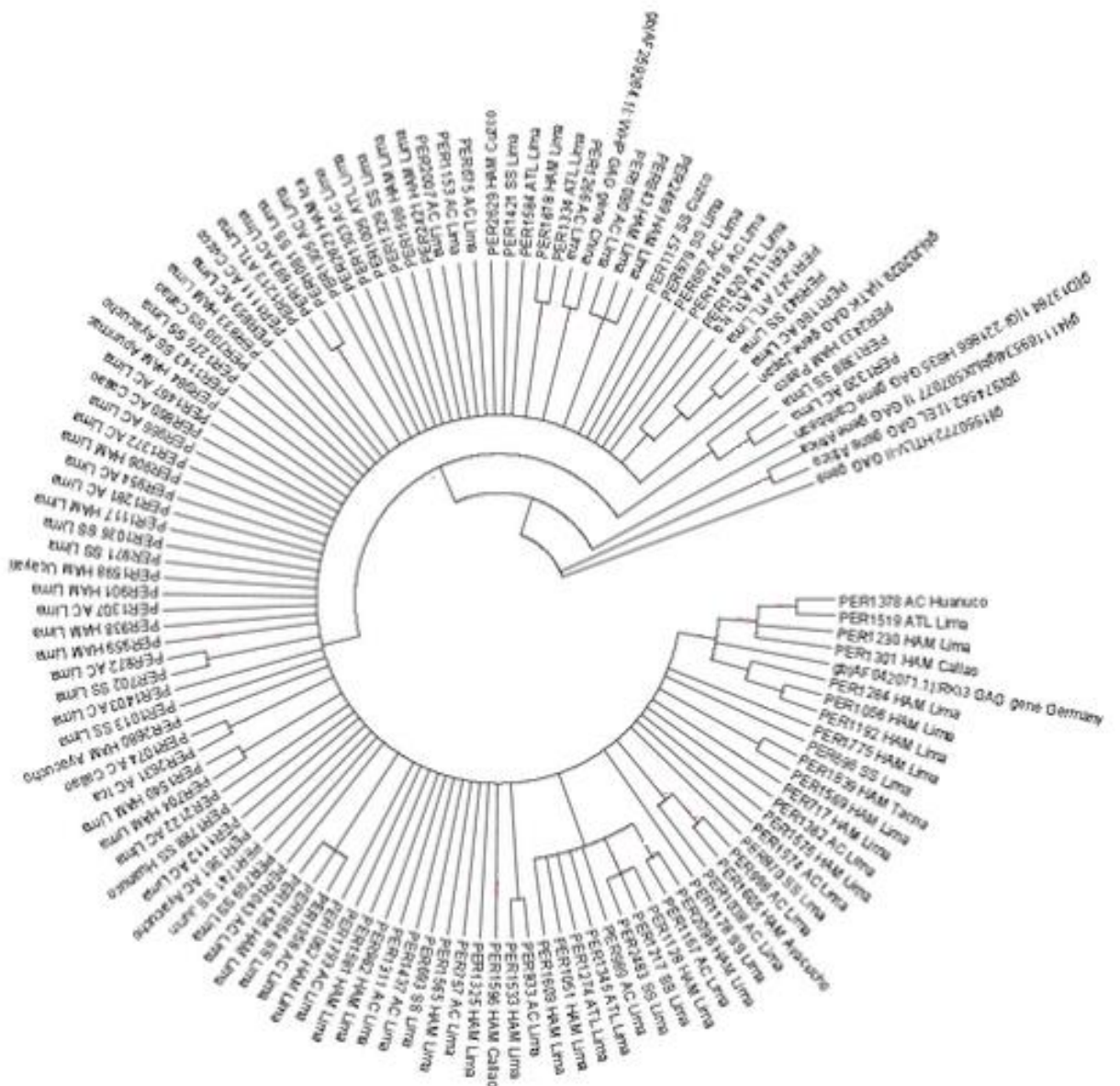


Figura 14. Árbol filogenético del gen *gag*

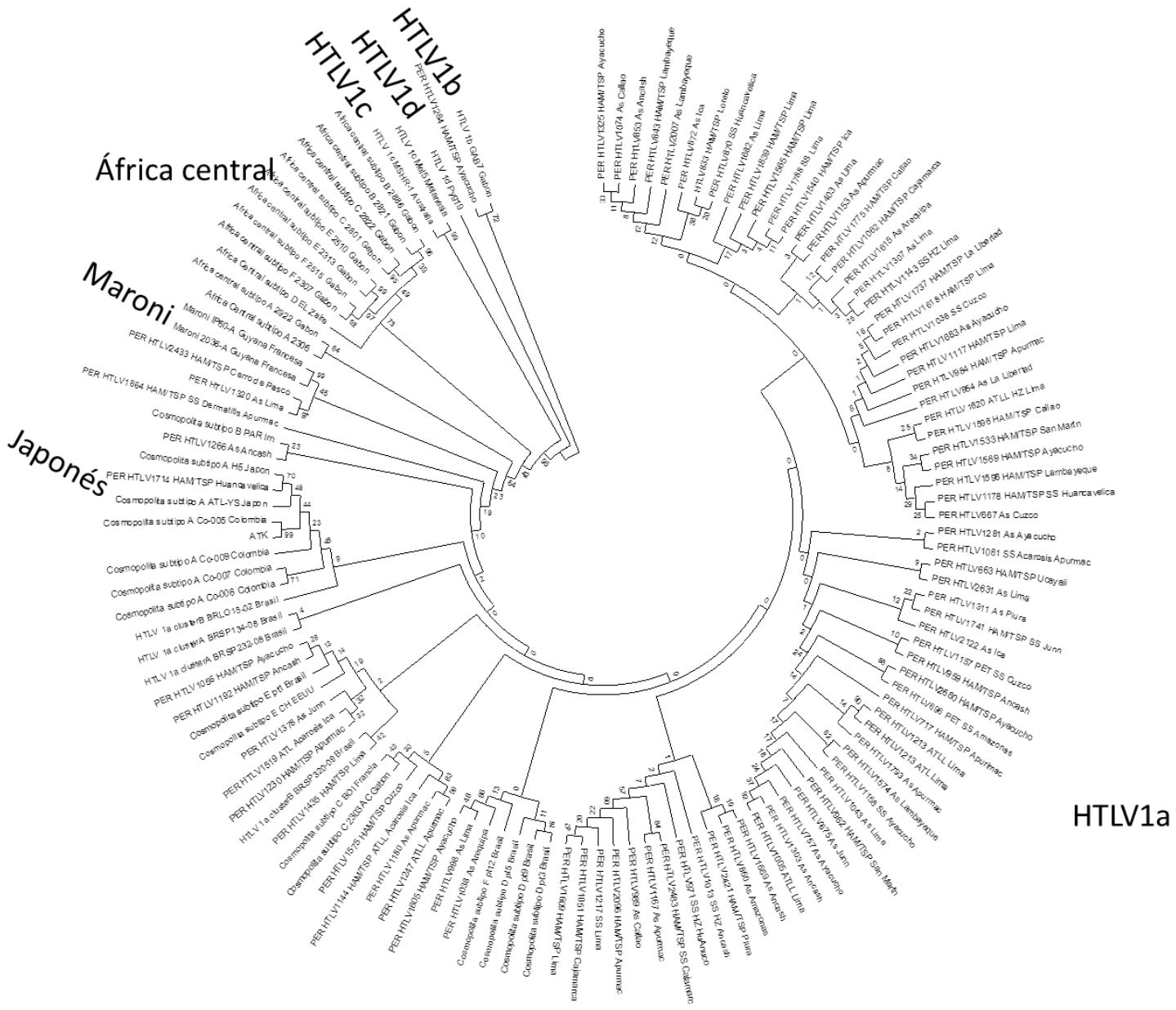


Figura 16. Árbol filogenético del gen *env*

7.1.3. Producción de proteínas recombinantes

7.1.3.1. Producción de las proteínas recombinantes rGag270 y rGag429

Se produjo la proteína completa de Gag (rGag429) de 53kDa (ver figura 17) y el fragmento de Gag (rGag270) de 22kDa (ver figura 18) en *E. coli* Rosetta (DE3). Al realizar los ensayos de purificación no se logró obtener proteínas recombinantes purificadas debido a que las colas de Histidina no se unieron a la columna de cromatografía de afinidad a níquel.

En los análisis mediante Western Blot (figura 17; carriles del 10 al 12), al utilizar el anticuerpo monoclonal anti-p19 (ver tabla 9, sección 6.3.7), se observaron 2 bandas de mayor intensidad; la primera de 53kDa correspondiente con la proteína recombinante rGag429 y la segunda aproximadamente a un tamaño de 37kDa. Al comparar con el carril 9 (correspondiente con el cultivo no inducido) ambas proteínas se estarían produciendo tras la inducción con 1mM de IPTG.

De igual forma, en los carriles del 2 al 4, que fueron enfrentados con un pool de sueros HTLV-1 positivos, se observaron bandas intensas tanto con la proteína recombinante rGag429 de 53kDa como con la banda de 37kDa. Mientras que en el carril 1, correspondiente al cultivo no inducido enfrentado al mismo pool de sueros positivos, no se observó reactividad con ninguna de estas proteínas.

En el caso de los carriles del 5 al 8, que fueron enfrentados con un pool de sueros HTLV-1 negativos no se observaron bandas correspondientes con la proteína recombinante rGag429 (53kDa) y la banda de 37kDa.

Cabe mencionar que tanto en los carriles del 1-4 (enfrentadas con un pool de sueros positivos) como en los carriles del 5 al 8 (enfrentadas con un pool de sueros negativos) presentaron bandas correspondientes con otras proteínas provenientes de *E. coli.*, producidas por los anticuerpos en los humanos.

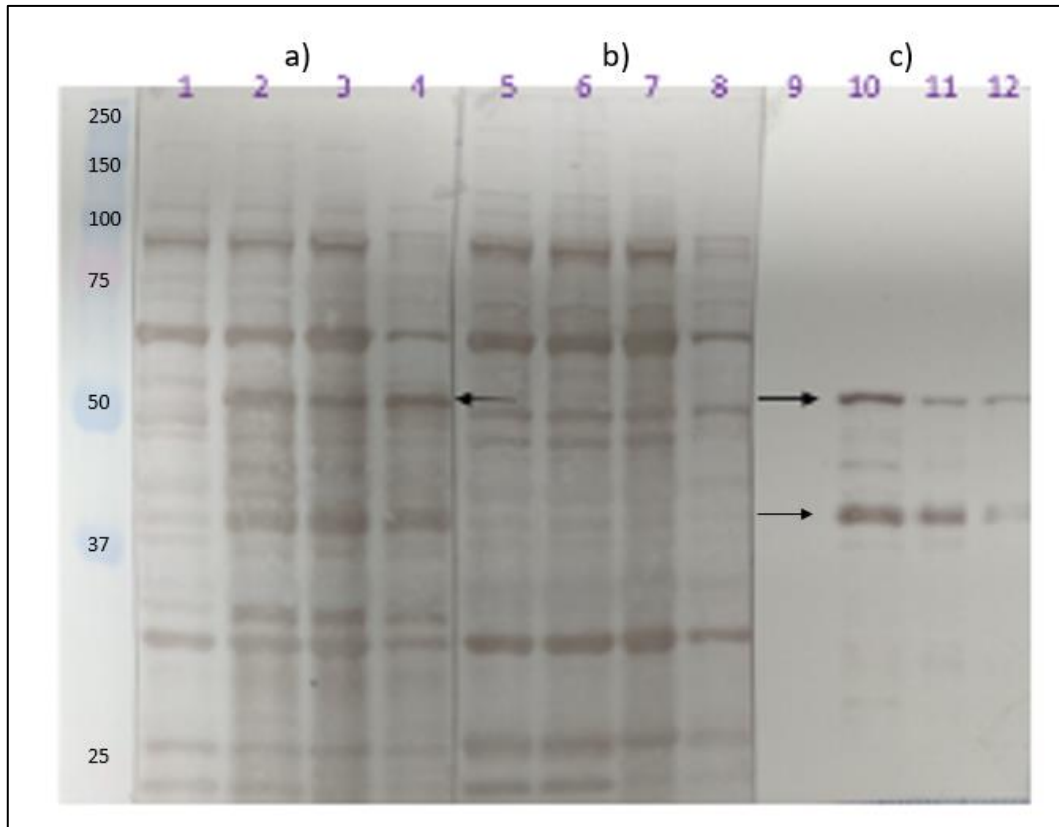


Figura 17. Análisis de la expresión de la proteína rGag429 (53kDa) enfrentada con pool de sueros positivos (a), pool de sueros negativos (b) y anticuerpo monoclonal anti p19HTLV-1 (c) 1, 5, 9: rGag429 sin inducir 2-4, 6-8, 10-12: Expresión de rGag429 con 1mM de IPTG por 4 horas a 22°C
 →: rGag429 (53 kDa)
 → : proteína desconocida (37 kDa)

En la figura 18, se muestra el Western Blot de la proteína rGag270 (23kDa) enfrentada a un pool de sueros positivos (ver figura 18a) y al anticuerpo monoclonal anti HTLV-1 p19 (ver tabla 9) (ver figura 18b).

En la figura 18a se observa una banda en el carril 2a y 3a (correspondiente con la expresión de rGag270 inducida con 1mM de IPTG) que se encuentra ausente en el carril 4a (correspondiente a la proteína rGag270 sin inducir). Mientras que en la figura 18b se observan en el carril 2b y 3b una banda correspondiente con la proteína recombinante rGag270 de 23kDa.

Por otro lado, se observó que no existe diferencia notable entre el tiempo de expresión de la proteína durante 20 horas (carril 2a y 2b) y 5 horas (carril 3a y 3b).

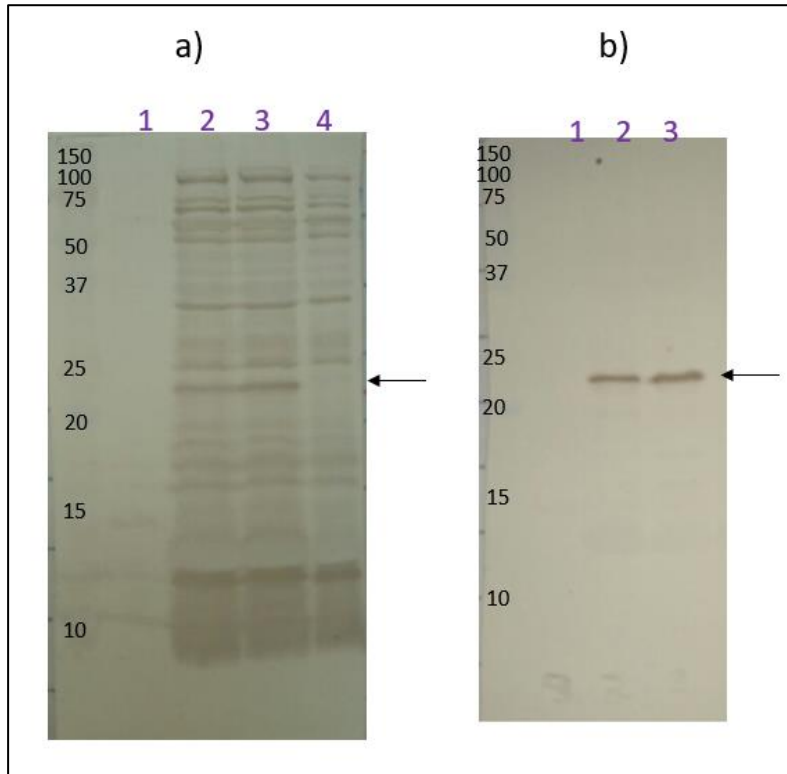


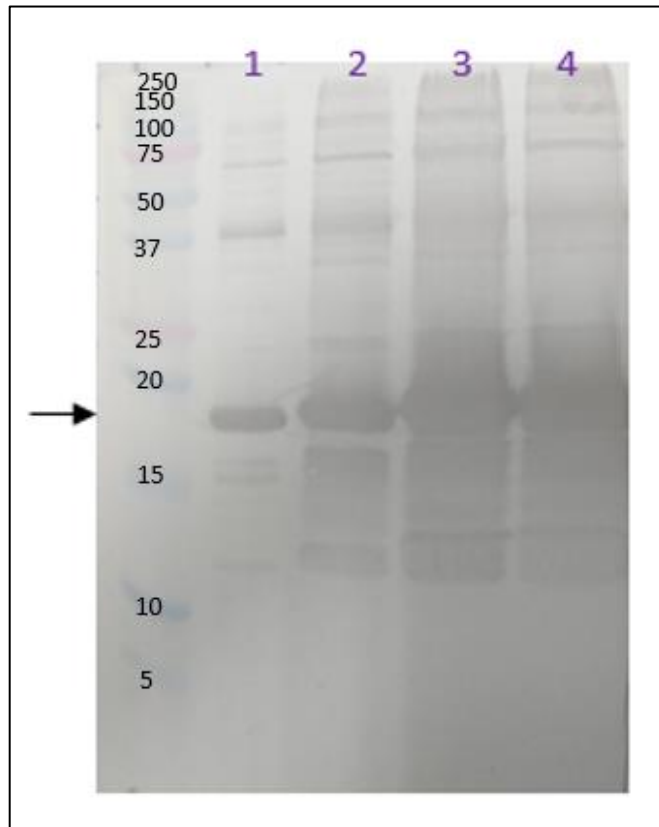
Figura 18. Análisis de la expresión de la proteína rGag270 (23kDa) enfrentada con pool de sueros positivos (a) y anticuerpo monoclonal anti-HTLV-1 p19 (b)
2a, 2b: rGag270 inducida con 1mM de IPTG por 20 horas a 22°C (pellet)
3a y 3b: rGag270 inducida con 1mM de IPTG por 5 horas a 22°C
1a y 1b: rGag270 inducida con 1mM de IPTG por 5 horas a 22°C (sobrenadante) 4a: 4: rGag 270 sin inducir
→: rGag270 (23 kDa)

7.1.3.2. Producción de las proteínas recombinantes rTax353 y rTax153

La proteína completa de Tax (rTax353) no pudo ser producida; solo se logró producir el fragmento de la proteína Tax (rTax153) de 17kDa (ver figura 19) en *E. coli* Rosetta (DE3). Al realizar los ensayos de purificación de rTax153 se obtuvieron mejores resultados comparado con la purificación del resto de las

demás proteínas recombinantes producidas. Sin embargo, no se logró purificar totalmente la proteína recombinante rTax153.

En la figura 19 se muestra el Western Blot con 4 concentraciones de la proteína rTax153 purificada enfrentada a un pool de sueros positivos a HTLV-1. Observamos bandas intensas que aumentan de tamaño al aumentar la cantidad de proteína dispuesta en cada carril.



**Figura 19. Enfrentamiento de distintas concentraciones de rTax153 con pool de sueros positivos a HTLV-1 por Western Blot (1: 0.15ug, 2: 0.65 ug, 3: 1.30ug, 4: 1.95ug)
→: rTax153 (17 kDa)**

7.1.3.3. Producción de la proteína recombinante rEnv1

Se introdujo el plásmido correspondiente a rEnv1 en 3 distintos hospederos, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3) y *E. coli* Lemo 21(DE3). Tras realizar los ensayos de inducción de la expresión solo se logró la producción de la proteína recombinante rEnv1 de 23kDa en *E. coli* Lemo 21(DE3) (ver figura 20).

En la figura 18, se muestra el Western Blot de la proteína rEnv1 (23 kDa) enfrentada a un pool de sueros HTLV-1 positivos. En los carriles 1 y 2 correspondientes a la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) observamos que no se expresó la proteína rEnv1. De igual forma observamos en los carriles 13 y 14 que tampoco se pudo producir la proteína rEnv1 en *E. coli* Rosetta (DE3).

Mientras en el caso de la expresión del fragmento de Env en *E. coli* Lemo21(DE3) se logró la producción de la proteína recombinante rEnv1 (ver carriles 3-12)

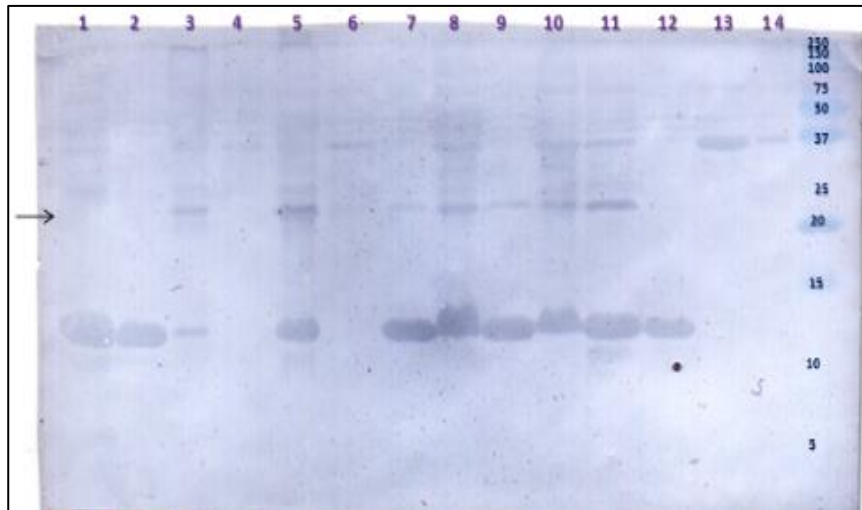


Figura 20. Western Blot de la expresión de la proteína rEnv1(23kDa) en *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Lemo21 (DE3) y *E. coli* Rosetta (DE3) enfrentada a pool de sueros positivos

1,2: Expresión de rEnv1 en *E. coli* BL21 (DE3)

3,5,7-12: Expresión de rEnv1 en *E. coli* Lemo21 (DE3) (pellet)

4,6: Expresión de rEnv1 en *E. coli* Lemo21 (DE3) (sobrenadante)

13,14: Expresión de rEnv1 en *E. coli* Rosetta (DE3)

—→: rEnv1 (23 kDa)

Al comparar la concentración de Ramnosa en el medio de cultivo de *E. coli* Lemo21(DE3)-rEnv1 correspondiendo 3 y 4 (0 μ m de Ramnosa), 5 y 6 (50 μ M de Ramnosa) y 7 (100 μ M de Ramnosa), 8 (200 μ M de Ramnosa), 9 (500 μ M de Ramnosa), 10 (750 μ M de Ramnosa), 11 (1000 μ M de Ramnosa) y 12 (2000 μ M de Ramnosa) no se observó diferencia significativa en la producción de proteína a distintas concentraciones de Ramnosa (ver figura 20). Sin embargo, se consideró usar 50 μ M de Ramnosa en el medio de cultivo.

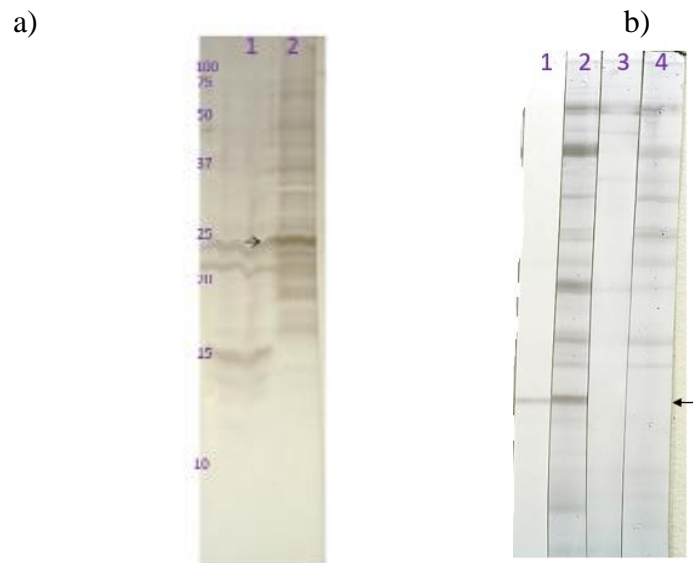


Figura 21. Western Blot de la expresión de la proteína rEnv1 (23kDa) en *E. coli* Rosetta (DE3) y *E.coli* Lemo21 (DE3)
a) Western Blot de la expresión de la proteína rEnv1 en *E.coli* Rosetta (DE3) (1a) y *E.coli* Lemo21 (DE3) (2a)
b) Enfrentamiento de proteína expresada en *E.coli* Lemo21 (DE3)
1b: anticuerpo monoclonal anti-gp46, 2b: suero positivo, 3 y 4:sueros negativos
→: rEnv1 (23 kDa)

Para comparar la expresión de la proteína rEnv1 entre 2 hospederos se realizó un Western Blot enfrentando a la proteína rEnv1 expresada en *E. coli* Rosetta (DE3) y expresada en *E. coli* Lemo21 (DE3) con un pool de sueros HTLV-1 positivos (ver figura 21a). Se corroboró la obtención de proteína recombinante rEnv1 en *E. coli* Lemo21 (DE3). En la figura 21b se observa la proteína recombinante rEnv1 enfrentada al anticuerpo monoclonal anti-gp46HTLV-1(ver tabla 9) (carril 1). Además, se observa una banda intensa del mismo tamaño igual que la enfrentada a un suero HTLV-1 positivo (carril 2) y ausente en el caso de enfrentada a sueros negativos (carriles 3 y 4)

7.1.3.4. Producción de las proteínas recombinantes rEnv488 y rEnv2

La proteína completa de Env (rEnv488) no pudo ser producida; solo se logró producir un segundo fragmento de Env (rEnv2) de 13kDa (ver figura 22) en *E. coli* Lemo21 (DE3).

Por otro lado, en la figura 22 se muestra el Western Blot de la proteína rEnv2 sin purificar (carril 1) y purificada (carril 2) enfrentadas al anticuerpo monoclonal anti-gp21HTLV-1 (ver tabla 9). Al respecto, observamos que al realizar los ensayos de purificación de rEnv2 se perdía proteína debido a que no toda se unía a la columna de cromatografía de afinidad a níquel (ver figura 22)

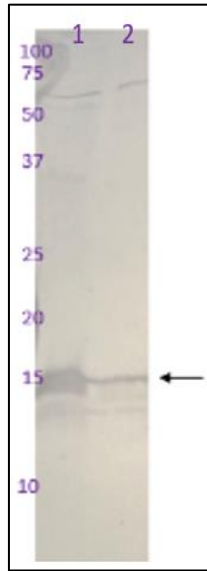


Figura 22. Enfrentamiento de rEnv2 con anticuerpo monoclonal anti-gp21-HTLV-1 por Western Blot

1: rEnv2 sin purificar

2: rEnv2 purificada

→: rEnv2 (13 kDa)

7.1.4. Caracterización diagnóstica de los extractos que contenieron las proteínas recombinantes de HTLV-1

Tras realizar los ensayos de purificación no se pudo obtener proteínas recombinantes puras; por ello, se usaron los extractos crudos para realizar los ensayos de Western Blot enfrentándolos con el panel de sueros.

A partir de las Tablas de contingencia (ver anexo 2) se realizó el cálculo de los parámetros de valoración diagnóstica de los extractos que contienen las proteínas recombinantes (ver la la tabla 13 que resume estas medidas). Es así que

observamos que la proteína completa de Gag (rGag429) posee la más alta sensibilidad (100%) pero la más baja especificidad (48%). Mientras que en el caso del fragmento de Gag (rGag270) tiene al igual que la proteína completa de Gag sensibilidad (100%) y el segundo nivel más alto de especificidad (80%). En el caso de rTax153 este presenta una sensibilidad de 97% y una especificidad del 72%. Mientras que en el caso de rEnv1 presenta una sensibilidad de 87% y la especificidad más alta (88%).

Tabla 13. Parámetros de valoración diagnóstica de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	Valor Predictivo Positivo (95%IC)	Valor Predictivo Negativo (95%IC)
rGag429	100% (89-100%)	48% (30-70%)	70% (56-82%)	100% (76-100%)
rGag270	100% (89-100%)	80% (61-91%)	86% (71-94%)	100% (84-100%)
rTax153	97% (84-99%)	72% (52-86%)	81% (66-91%)	95% (75-99%)
rEnv1	87% (71-95%)	88% (70-96%)	90% (74-97%)	85% (66-94%)
rEnv2	19% (9-36%)	68% (48-83%)	43% (21-67%)	40% (27-56%)

En el caso de los valores predictivos positivos (VPP) por cada proteína observamos que el valor de VPP más alto es de 90% correspondiente a rEnv1; seguido por rGag270 con un VPP de 86%. Estos valores nos indicarían que menos del 15% estaría siendo incorrectamente considerado como positivo.

Por otro lado, observamos que el valor predictivo negativo (VPN) tanto para la proteína completa de Gag (rGag429) y el fragmento de Gag (rGag270) es de 100%, seguido por un VPN de 95% en el caso de rTax153, así como un VPN de 85% de rEnv1.

Comparación de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes mediante análisis de las curvas ROC

Usando los valores de sensibilidad y especificidad por cada una de las proteínas se determinó las curvas ROC (ver figura 23). El extracto que tiene mayor valor diagnóstico es aquel que está más cerca al lado superior izquierdo, en la figura 23 observamos que aquella curva ROC con mayor valor diagnóstico es el extracto conteniendo la proteína rGag270 (ABC=0.90), seguida por rEnv1 (ABC=0.88) y por rTax153 (ABC=0.84).

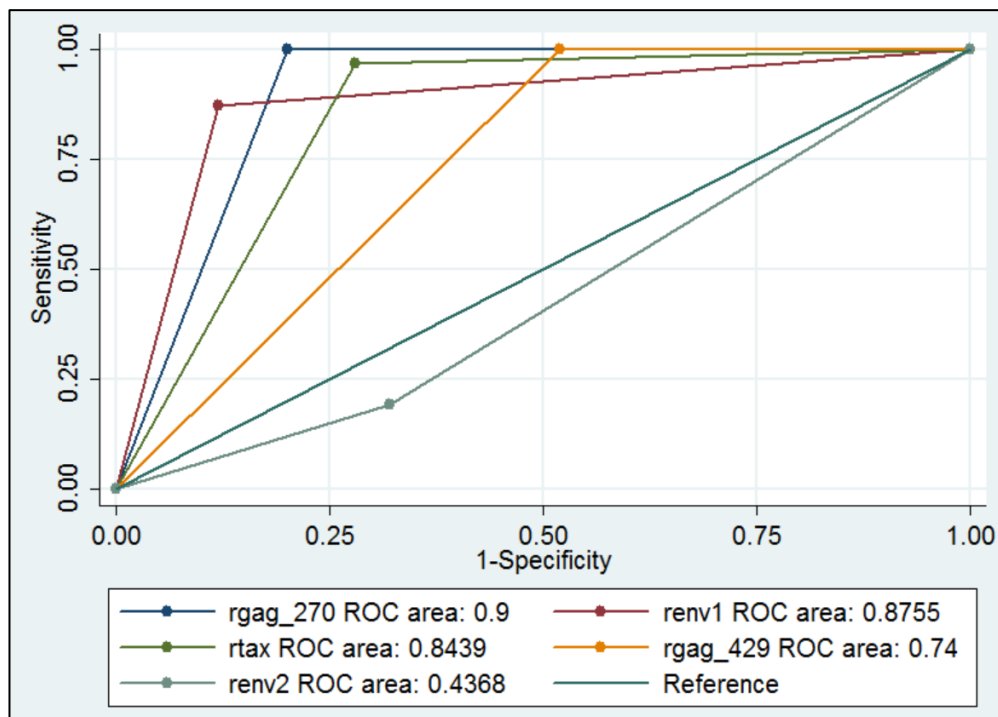


Figura 23. Curva ROC de las proteínas recombinantes de HTLV-1

Al analizar las ABC de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes (ver tabla 14), se observa que el extracto conteniendo la proteína rGag_270 tiene el mayor valor de ABC de 0.90. Mientras el valor de ABC sea más cercano a 1 es mejor para ser usado en diagnóstico. Haciendo uso del sistema de categorización TAPC se podría nombrar con la categoría de “Excelente” (137) para su uso en diagnóstico. En el caso de rEnv1 (ABC=0.87) y rTax153 (ABC=0.84), ambas

entrarían en la categoría de “Muy bueno” (137) para su uso en diagnóstico. Mientras que para el caso de rGag429 (ABC=0.74) entraría en la categoría de “Bueno” (137). Finalmente, por los valores resultantes, la proteína rEnv2 (ABC=0.44) entraría en una categoría menor a la de “Malo” (137) para su uso en diagnóstico.

Tabla 14. Áreas bajo las curvas ROC (ABC) de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes

Extractos que contienen las proteínas recombinantes	ABC (95%IC)
rGag429	0.74(0.64-0.84)
rGag270	0.90(0.82-0.98)
rTax153	0.84(0.75-0.94)
rEnv1	0.87(0.79-0.96)
rEnv2	0.44(0.32-0.55)

Ho:
 $A(rGag429)=A(rGag270)=A(rTax153)=A(rEnv1)=A(rEnv2)$
 $\chi^2(4)=54.08$ $Prob>\chi^2 =0.0000$

8. Discusión

Considerando que a) el 90% de los infectados se mantiene como asintomáticos (5), b) no existe una cura para poder eliminar el virus y/o indicio biológico para evitar el desarrollo de algunas de las enfermedades asociadas como por ejemplo PET (70), c) la población y el personal de salud desconoce en muchos casos sobre la infección por este virus(70); la política pública más importante para disminuir la expansión silenciosa del virus (70) sobre todo en países endémicos como el nuestro (4) resulta primordial la prevención de la Infección por HTLV-1.

En nuestro país, los bancos de sangre son considerados el principal lugar dónde se pueden detectar casos de infección por HTLV-1 (23) lo cual permitiría brindarles la información necesaria y pertinente para disminuir la transmisión del virus en la población peruana. Sin embargo, la falta de recojo de resultados y la demora en la entrega de los resultados (72 horas-1semana) dificulta en gran medida el acceso a asesoría para los infectados por HTLV-1 (22). Por tales razones, atendiendo al contexto, resulta necesario que se genere una prueba de diagnóstico rápido (PDR) (22).

Actualmente no se cuenta con pruebas rápidas para la detección de infección por HTLV-1. Por ello, el propósito de esta tesis es producir proteínas virales con potencial diagnóstico que permitan posteriormente el desarrollo de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por HTLV-1 en bancos de sangre. Para lo cual primero se determinó secuencias consenso de los genes *gag*, *tax* y *env*; para adquirir plásmidos conteniendo las secuencias consenso, estas fueron introducidas en un sistema procariota para inducir la expresión de estas proteínas y enfrentarlas a un panel de sueros mediante ensayos de Western Blot y realizar la caracterización diagnóstica de estas proteínas recombinantes para su uso en diagnóstico y en la generación futura de la PDR a ser usada en bancos de sangre.

8.1. Determinación de secuencias consenso

Se obtuvieron secuencias consenso de los genes virales *gag*, *tax* y *env* de HTLV-1 (ver sección 7.1.1), para lo cual se evaluaron diversas muestras de pacientes infectados con HTLV-1 con diferentes manifestaciones clínicas asociadas a infección por HTLV-1, como pacientes con PET, ATLL, Estrongiloidiasis y

Asintomáticos (tabla 4). Asimismo, estos pacientes provienen de diferentes lugares de procedencia y/o nacimiento (figuras 11 y 12). Las 143 muestras seleccionadas no tenían relación consanguínea o de pareja para evitar la redundancia de genotipos virales considerando que los modos de transmisión son la Lactancia Materna, la Vía Sexual y Parenteral. Todas las muestras analizadas de los pacientes seleccionados pertenecen a la cohorte de HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, los cuales brindaron su consentimiento informado para el uso futuro de sus muestras.

Estudios realizados en Japón y Europa hacen uso de la cepa ATK de origen japonés como cepa de referencia de HTLV-1; y su secuencia de aminoácidos y ADN viene siendo usada en la producción de pruebas diagnósticas. Sin embargo, no se ha determinado una secuencia consenso de HTLV-1 en Sudamérica y debido a que existen dos teorías de igual relevancia sobre la llegada de HTLV-1 a América Latina, por tales razones, se cuestiona que en América Latina no debería usarse como cepa de referencia a ATK. Siendo la primera teoría correspondiente a la migración prehistórica de hace 11 000-13 000 por el estrecho de Bering, por la cual el virus se transmitió primero al Norte de América, se esparció al Caribe para finalmente ser transmitida a Sudamérica (41); por lo que hacer uso de la cepa ATK como referencia sería compatible con esta teoría. Sin embargo, considerando la segunda teoría sobre la llegada de HTLV-1, la cual provino de África hace aproximadamente 600 años por el comercio de esclavos africanos durante la colonización de América, con lo cual el virus se expandió por Norteamérica, El Caribe y Sudamérica (41), por lo que la cepa de referencia sería una secuencia homóloga a una cepa de referencia de origen Africano, diferente a la ATK. Por tales razones, resulta necesario determinar progresivamente las secuencias consenso de los genes *gag*, *tax* y *env* porque se desconoce el origen exacto del virus en nuestro país.

Al analizar las muestras que contribuyeron en la generación de las secuencias consenso, se observó que 15 muestras se encontraron incompletas para el gen *gag*, *tax* y *env*. Estas muestras presentaron carga proviral baja y coincidentemente

correspondieron a muestras de Asintomáticos. Una posibilidad de no presentar secuencias completas es que se deba a que probablemente estas cepas serían provirus defectivos. Las deleciones en el genoma proviral de HTLV-1 ha sido reportado por diversos autores; un estudio realizado en el 2011 reportó que ciertos individuos con HTLV-1 presentan como clonas predominantes provirus con su secuencia incompletas (102); a los que se les ha denominado provirus defectivos. Se presume que el portar provirus defectivos que conservan genes estructurales sería un riesgo para desarrollar PET (138). Mientras que presentar provirus defectivos que mantienen genes reguladores de *pX* sería un riesgo para desarrollar ATLL (138), se ha descrito que tumores celulares de diferentes estadios de ATLL presentan secuencias incompletas en *gag* y/o *env* sin presentar cambios en la región *pX* (99) .

La presencia de provirus defectivos puede deberse a la selección de clonas por el sistema inmune (139). En etapas tempranas de la infección dentro del genoma humano se integran clonas virales completas y el sistema inmune las elimina al reconocer clonas infectadas. Se hipotetiza que la deleción observada en los provirus defectivos ocurre después de la integración completa del provirus en el genoma celular debido a que muchos provirus defectivos no pierden el LTR 5' (139), pero si pierden *gag*, *pol* y *env*; mientras que la región *pX* permanece bien conservada a pesar de la frecuente deleción de los otros genes (140)

Hasta ahora existen reportados 2 tipos de provirus defectivos según la parte del genoma que se delecciona (101); siendo el del tipo 1 aquel que pierde parte de su secuencia, integrándose en el genoma sin parte de la secuencia *gag*, con ausencia de *pol* y *env*; pero conservando el 5'LTR, parte proximal al extremo 5' de *gag* y manteniendo la secuencia *pX* y el 3'LTR. Los virus defectivos de Tipo 2 solo presentan el 3'LTR y la región *pX* dentro de su secuencia y no presenta la secuencia el resto de la secuencia como el 5'LTR, la región *gag*, *pol* y *env*. Posiblemente las mismas muestras que no presentan su secuencia completa en *gag* y *env*, pero si presentaron *tax* sean provirus defectivos del tipo 2. La aparición de provirus defectivos se ha reportado en muestras de pacientes asintomáticos (141) y pacientes que desarrollan ATLL (99) en nuestro caso las muestras que

presentaron secuencias de *tax*, *gag* y *env* incompletos se trataban de muestras de asintomáticos y con carga proviral baja.

Por otro lado, respecto a las 53 secuencias incompletas de Gag mencionadas en la sección 7.1.1 presentaban el segundo y tercer fragmento de Gag incompletos coincidentemente se truncaban después de secuencias con alto contenido de guanina y citosina, lo que conlleva a la formación de estructuras secundarias no permitiendo la actividad de la Taq polimerasa ocasionando que no se pueda completar la amplificación de esas secuencias (142).

8.2. Análisis de la distribución filogenética de los genes *gag*, *tax* y *env*

Se construyeron 3 árboles filogenéticos haciendo uso de las secuencias completas de *tax* (n=130), *gag* (n=90) y *env* (n=78). En ningún caso se encontró agrupaciones entre las secuencias respecto a la presentación de alguna manifestación clínica, el lugar de nacimiento o el lugar de procedencia (ver figuras 14, 15 y 16). Esto significa que no existe asociación significativa entre una determinada mutación y la presentación de una manifestación clínica, lo que corresponde con lo reportado por otros investigadores (143-145).

Tanto en el árbol obtenido con *gag* (ver figura 14) como con *tax* (ver figura 15) se observó que las cepas peruanas agruparon con el subtipo HTLV-1a cosmopolita y muestran una alta homología (95%) en secuencia de nucleótidos con la cepa de referencia ATK. El porcentaje de identidad de las secuencias de *gag*, el porcentaje de identidad de las secuencias de nucleótidos fue de 99.3%; mientras que en el caso de *tax* peruanas fue de 98.8%.

En el caso de *env* (ver figura 16), el árbol filogenético construido presentó nodos diversificados y agrupados y presentaron un porcentaje de identidad de 95%. Una de las muestras agrupó con HTLV-1b y el resto con HTLV-1a, solo 3 muestras se agruparon con ATK y otras dos cepas japonesas al mismo tiempo. Asimismo, otras 2 muestras se agruparon con muestras del Caribe. Sin embargo, el resto de las secuencias no se agruparon con secuencias de África Central ni con las mencionadas japonesas.

El árbol filogenético construido con *env* muestra que las cepas peruanas analizadas están evolutivamente más cerca al subtipo HTLV-1a cosmopolita Transcontinental (ver figura 16); que agrupa tanto a algunas cepas asiáticas como cepas africanas; es decir las cepas de HTLV-1 presentes en pacientes peruanos compartirían una historia evolutiva tanto con cepas de Asia como África Central y se debe considerar que su aporte se hizo en un periodo de tiempo evolutivo más cercano y posterior posiblemente colonial. Otra hipótesis es que las cepas de Asia y Latinoamérica, provienen de un ancestro común; es decir una cepa Africana HTLV-1 cosmopolita (41).

El genoma de HTLV-1 es estable, sin embargo, la secuencia del gen *env* presenta cierta diversidad. Tanto el gen Env como el LTR son usados para estudiar los subtipos y subgrupos de HTLV-1. Se ha considerado que la diversidad en *env* se debe a la presión de selección del sistema inmune (23, 146, 147), el cual es ejercido sobre este gen que codifica las proteínas de envoltura del virus por ser un blanco de la respuesta inmunitaria, y la expansión clonal permite que se mantengan las mutaciones en respuesta a la presión de selección, proveyéndoles a las clonas seleccionadas una ventaja para su supervivencia en el tiempo (123).

En general los genes *gag*, *tax* y *env* se encuentran conservados, lo cual se debe a las características mismas de la estabilidad del genoma de HTLV-1. Esta alta estabilidad genética se debe a la expansión clonal del virus integrado en el genoma celular, lo que origina una baja tasa de sustitución de nucleótidos (92), además el genoma proviral se mantiene estable por los mecanismos moleculares de corrección en la replicación que tiene la célula infectada. Siendo así, el genoma proviral se replica preferente y principalmente por expansión clonal en células no germinales en comparación con la transcripción reversa, lo que permite la conservación del genoma de HTLV-1. La estabilidad genética de *gag*, *tax* y *env* se preserva para mantener la funcionalidad de éstas (144).

Asimismo, no se observó asociación entre la presencia de una mutación y de un determinado lugar de nacimiento o de procedencia. Es importante mencionar la dificultad que existe en estudiar la diversidad de los genes *gag*, *tax* y *env* según el lugar de procedencia o de nacimiento. Es difícil enmarcar a una cepa a un lugar

específico, debido a que la migración en nuestro país es alta (148) y en un mismo núcleo familiar se observan generaciones provenientes de distintos lugares de nuestro país, en muchos casos es difícil determinar si la infección proviene por la ruta madre-hijo o por relaciones sexuales o por transfusión sanguínea. Por lo que asegurar que no se observó diferencia alguna entre los lugares de procedencia probablemente resulta incierto; ya que se tendría que considerar los modos de transmisión en cada cepa, así como los lugares de procedencia de los abuelos para determinar el lugar correcto de procedencia de cada cepa.

8.3. Producción de proteínas recombinantes

Se produjo las proteínas recombinantes rGag429, rGag270 y rTax en *E. coli* Rosseta (DE3), esta cepa proporciona tRNAs para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA (131), en el caso de Gag se necesitaron todos estos tRNAs y en el caso de Tax todos excepto el tRNA para el codón CCC.

En el caso de Gag, se produjo tanto la proteína completa recombinante (rGag429) como el fragmento (rGag270) (ver sección 7.1.3.1) Sin embargo, se observó que al producir la proteína rGag429 (53kDa) se expresaba una proteína más pequeña (37 kDa, aproximadamente). Es importante considerar que en células humanas infectadas por HTLV-1 se expresa la proteína Gag como proteína precursora (53 kDa), después de procesada la proteína por la Proteasa de HTLV-1 se obtienen los productos p19, p24 y p15; para obtener estas productos se obtienen intermediarios de corte, siendo éstos; p26, p28, p32 y p36. (149) Por lo que probablemente la proteína más pequeña de aproximadamente 37 kDa se trate de un intermediario de corte (p36), que fue procesada por una Aspartil Proteasa de *E. coli*.

En el caso de la expresión de proteínas de Tax, no se produjo la proteína completa rTax353 y solo se produjo el fragmento de Tax (rTax153) (ver sección 7.1.3.2).

En el caso de los fragmentos de Env (rEnv1 y rEnv2) estos se produjeron tras inducir la expresión de estas en células *E. coli* Lemo21 (DE3) (ver secciones 7.1.3.3 y 7.1.3.4). *E. coli* Lemo21 (DE3) permite la expresión de proteínas de membrana y proteínas consideradas tóxicas para *E. coli* tras inducirse su expresión (150). Se optó usar este hospedero debido a que la proteína Env posee

regiones hidrofóbicas, presentes en las proteínas de membrana, que inhiben el crecimiento de *E. coli* (151); se ha reportado que la expresión de proteínas de membrana causan toxicidad dentro de *E. coli* Rossetta (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) (152) razón por la cual probablemente no se pudo producir en estos 2 hospederos (ver figura 20).

Por lo general, al expresar proteínas de membrana en *E. coli* se obtiene en poca cantidad debido a que limitan el crecimiento de la bacteria porque causan toxicidad y el uso de la energía la derivan en la expresión de proteínas de estrés (151, 152). La cepa *E. coli* Lemo21 (DE3) se recomienda para la expresión de proteínas de membrana (132, 133), esta cepa facilita también el plegamiento correcto de proteínas de membrana, posee el plásmido pLys con promotor dependiente Ramnosa que permite la producción de mayor cantidad de T7 Lisozima que controla la T7 RNA polimerasa, manteniendo una estricta regulación de la expresión (132, 133) por lo que el uso de Ramnosa promueve la expresión de mayor cantidad de proteínas en *E. coli* Lemo21 (DE3) (150, 153). Sin embargo, en nuestro caso no se observó diferencia en la expresión de rEnv1 al adicionar distintas concentraciones de Ramnosa (ver figura 20).

No se pudo expresar la proteína completa de Env (rEnv488), lo que se encuentra en la línea de las investigaciones de otros autores que también han presentado dificultades al expresar la proteína completa de Env en bacterias (154), levaduras (155), y células de insecto (baculovirus) (156). Se ha reportado que en el caso de la expresión de Env en Baculovirus se produce gran cantidad pero de forma insoluble (157). Por otro lado, se ha recomendado para la expresión de Env el uso del sistema vaccinia virus/T7 polimerasa, este sistema permitiría obtener gran cantidad de proteína recombinante Env con sus modificaciones postraduccionales presentes como las 5 glicosilaciones que permitirían su interacción con anticuerpos conformacionales (158).

Las proteínas recombinantes fueron producidas con colas de Histidina para purificarlas mediante cromatografía de afinidad a níquel. Sin embargo, no se obtuvieron proteínas purificadas. Al realizar un Western Blot del sobrenadante

descartado en el proceso de purificación se observó que la proteína no se unía a la columna de purificación (data no se muestra).

En los ensayos de Western Blot haciendo uso del anticuerpo monoclonal Penta.His-HRP (Quiagen, código: 34660) y el Anti His-C-term-HRP (Sigma Aldrich, código: D0426) no se observó con ninguno de los 2 anticuerpos monoclonales bandas correspondientes a las proteínas recombinantes que se produjeron (data no se muestra). Sin embargo, al usar los anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína recombinante (ver sección 7.1.3.1, 7.1.3.2, 7.1.3.3, 7.1.3.4), si se observaron bandas correspondientes a cada una de las proteínas lo que posiblemente nos indicaría que el anti-His no se estaría uniendo a las colas de Histidina de las proteínas recombinantes.

Tanto el hecho de que no se uniera el anticuerpo monoclonal anti-His como el que no se unieran las proteínas recombinantes a la columna posiblemente se deba a que se estarían escondiendo las colas de Histidina por la conformación tridimensional y el plegamiento de las proteínas haciendo inaccesible las colas de Histidina (159-161) y la otra posibilidad es que se estarían degradando las colas de Histidina (162-164) por lo que al estar escondidas o ausentes no se estarían uniendo al Anti-His y a la columna de purificación con níquel.

Por lo que al no poder purificar cada una de las proteínas se usó extracto crudo conteniendo cada una de las proteínas recombinantes en los ensayos de caracterización diagnóstica enfrentando estos extractos crudos con el panel de sueros.

8.4. Caracterización diagnóstica de los extractos conteniendo las proteínas recombinantes

8.4.1. Análisis de los parámetros de valoración diagnóstica

Individuos infectados con HTLV-1 producen anticuerpos contra las proteínas Gag, Tax y Env, por lo que estas proteínas son las que se utilizan principalmente para diagnóstico. En el caso de otras proteínas de HTLV-1 que han sido

estudiadas; p12, p30 y la transcriptasa reversa, no se ha detectado anticuerpos contra éstas (165). Por tales razones, se optó por producir las proteínas Gag, Tax y Env.

La proteína Tax es considerada altamente inmunogénica y es la principal proteína blanco de los linfocitos T humanos. Esta proteína juega el rol más importante en la patogénesis de HTLV-1 e interactúa con 100 proteínas del hospedero aproximadamente (166). Un estudio realizado en el 2011 sugiere que medir anticuerpos anti-Tax permite evaluar la progresión de la enfermedad (165), ya que la reactividad entre PET, Asintomáticos y ATLL frente a Tax es diferenciada. En nuestro estudio al medir la reactividad positiva frente a rTax153 se obtuvo una sensibilidad del 97%. Probablemente la sensibilidad de rTax153 podría haber sido el 100%. Sin embargo, al analizar la reactividad de rTax153 entre las muestras HTLV-1 positivas confirmadas, observamos que solo una muestra HTLV-1 positiva confirmada no presentó reactividad con rTax153; esta perteneció al grupo ATLL (n=4). Se ha reportado que en pacientes ATLL hay menor producción de anticuerpos anti-Tax que en PET y Asintomáticos. Por ejemplo, un estudio realizado en 1989 describió que los niveles de anticuerpos anti-Tax son menores en ATLL (31%) comparado con PET (90%) y Asintomáticos (50-60%) (167). Posteriormente en 1994, otro estudio encontró el mismo patrón; el nivel de anticuerpos anti-Tax en ATLL (4-31%) es menor que en PET (del 71-93%) y Asintomáticos (27-37%) (168). Los anticuerpos anti-Tax se encuentran elevados en PET (169) debido a que la respuesta inmune en éstos está sobreestimulada. En el caso de ATLL, los bajos niveles se deben a la supresión del sistema inmune que no permite que se observe una respuesta adecuada, y además se debe a mutaciones presentes en Tax que funcionan como una táctica de evasión de la respuesta inmune ya que no sería reconocida por los anticuerpos anti-Tax producidos y por los CTLs (170).

Por otro lado, la especificidad de rTax153 fue de 72%, 10 muestras HTLV-1 negativas presentaron reactividad positiva con rTax153, se ha reportado la existencia de mimetismo molecular de los epítopes inmunodominantes de Tax y la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1(hnRNP A1) (171), lo cual implica que

anticuerpos anti-hnRNP A1 presentarían reacción cruzada con Tax, ya que estos anticuerpos pueden encontrarse en el suero. Esta reacción cruzada se debe a que la secuencia aminoacídica epitópica comprendida entre 346-353 de Tax (KHFRETEV) está presente en hnRNP A1 (171).

En el caso de Gag, la sensibilidad fue de 100% tanto de la proteína completa (rGag429) (100%) como de fragmento de Gag (rGag270). Los valores altos de la sensibilidad de las proteínas recombinantes de Gag corresponde con la evidencia de que la medición de anticuerpos anti-Gag permite diferenciar aquellas personas infectadas por HTLV-1 de las que no lo están (165). Sin embargo se ha reportado que la medición de anticuerpos anti-Gag no difiere entre las manifestaciones clínicas por HTLV-1 (165).

A pesar de presentar alta sensibilidad de 100% de las proteínas de Gag, la especificidad de rGag429 (48%) fue la más baja y en el caso de rGag270 (80%). La reactividad positiva de las muestras HTLV-1 negativas podría ser explicada por la reacción cruzada con anticuerpos presentes en los individuos que presentan mimetismo antigénico con las proteínas de HTLV-1. Se ha reportado que el genoma humano contiene una gran variedad de secuencias de retrovirus (172), a los que se les denominan retrovirus endógenos. Considerando que se ha reportado que algunos retrovirus endógenos estarían presentando homología con HTLV-1 (173), se justificaría la reacción cruzada observada, debido a que los anticuerpos producidos por la inducción de un retrovirus endógeno estarían uniéndose a las proteínas recombinantes usadas en el Western Blot.

Relacionado a estos retrovirus endógenos, se ha descrito la producción de autoanticuerpos contra la secuencia endógena relativa a HTLV-1 (HRES-1) (174) la cual presenta homología con HTLV-1. La secuencia HRES-1, que ha sido descrita que se encuentra en donadores normales (175) se encuentra en el cromosoma 1 en q42 y presenta 2 ORFs que codifican a las proteínas de Gag: p25 y p15 (176), se ha reportado que anticuerpos específicos que reaccionan contra péptidos de HRES-1 estarían reaccionando con las proteínas Gag de HTLV-1, por lo que podríamos decir que autoanticuerpos dirigidos contra el autoantígeno HRES-1 estarían presentando reacción cruzada con la proteína rGag429 y

rGag270 en las muestras negativas (177). Algunos autoanticuerpos que pueden presentar reacción cruzada con HTLV-1 son los producidos en pacientes con Esclerosis Múltiple, Lupus Eritomatosus, o Síndrome de Sjögren (174).

Asimismo, se ha reportado reacciones cruzadas con agentes infecciosos como virus y parásitos infecciosos como se puede dar con el virus SARS (178), virus Varicella Zoster (VZV) (179), Dengue virus (180), Virus Herpes Simplex – tipo 1 (181) y Plasmodium falciparum (182) debido a la homología de aminoácidos de la secuencia PDSDPQI de p19Gag de HTLV-1 con la proteína Exp-1 de Plasmodium falciparum (183). Asimismo, se ha encontrado reacción cruzada de la proteína Gag con proteínas celulares humanas como el Complemento, Colágeno, Tiroglobulina, HLA y citoquinas (184, 185) que están presentes en el suero humano.

La reacción cruzada de rGag_429 con 6 sueros de VIH (n=20) se debe a la homología que existe con la proteína Gag de VIH y de HTLV-1 (186). Adicionalmente es importante mencionar que el gen *tat* de VIH estimula la actividad transcripcional de HRES-1 lo que lleva a la sobreproducción de HRES-1 (187) que subsecuentemente estimularía la producción de anticuerpos que presentan reacción cruzada con Gag.

La proteína Env de la envoltura se expresa en la superficie de las células infectadas por virus y son reconocidas por el sistema inmune (188, 189). En células infectadas por HTLV-1, se sintetiza la proteína gp62 como una proteína precursora, la cual subsecuentemente en el aparato de Golgi se glicosila y cliva en 2 productos maduros: gp46 y gp21, los cuales forman parte de la bicapa fosfolipídica (190, 191). Estas 2 proteínas están unidas por interacciones no-covalentes y están ancladas en la superficie de las células infectadas o de viriones por medio del gp21 (192). Nuestro estudio logró producir Env como 2 fragmentos; en el primero rEnv1 que contenía gran parte de la subunidad gp46 de Env; mientras que en el segundo rEnv2 contenía gran parte de la secuencia de gp21.

Las glicoproteínas de envoltura gp21 y gp46 de HTLV-1 son esenciales en los primeros estadios de la infección viral y son las proteínas más inmunogénicas de todos los antígenos virales (193). Se obtuvo una sensibilidad con rEnv1 de 87%. Ello corrobora reportes anteriores sobre una fuerte respuesta inmune frente a gp46 entre infectados con HTLV-1 (194).

Sin embargo, en nuestro estudio no todas las muestras HTLV-1 positivas presentaron reactividad con gp46. Al respecto, es posible que la falta de reactividad positiva se deba al sistema de expresión usado, debido a que en un sistema procariota no se producen modificaciones postraduccionales como glicosilaciones; asimismo, los cambios en las glicosilaciones de Env pueden tener un impacto sobre la reacción con anticuerpos, por ejemplo se ha reportado que la mutación en el primer sitio de glicosilación de HTLV-1gp46 impacta severamente sobre la reactividad de Env con anticuerpos conformacionales (195). De esta manera, si la mutación en el primer sitio de glicosilación afecta la reacción con anticuerpos, la ausencia de esta glicosilación estaría afectando la reactividad positiva de anticuerpos como posiblemente estaría ocurriendo con rEnv1.

Otra posible explicación sobre la ausencia de reactividad puede atribuirse a que el suero de algunas muestras estaría restringido a epítopes conformacionales, por lo que los epítopes no estarían adquiriendo su conformación tridimensional al ser expresada en un sistema procariota. Sobre el particular, un estudio demostró que la respuesta humoral a gp46 estaría directamente relacionada a epítopes conformacionales (196), los cuales no pueden ser obtenidos en un sistema procariota.

En el caso de rEnv2, se ha reportado que individuos infectados con HTLV-1 muestran una fuerte respuesta frente a proteínas de envoltura gp21 (197-199). Sin embargo, en este estudio, contrario a lo que se esperaba, se obtuvo una sensibilidad con rEnv2 de 19%, resultados que no corresponderían con lo que otros autores han encontrado; la proteína gp21Env es usada en el diagnóstico de HTLV-1 y es considerada antígenica (200). Se han reportado secuencias epitópicas con alta reactividad dentro de la secuencia de gp21; por ejemplo la

secuencia 361-430 muestra reactividad específica al suero de infectados con HTLV-1 (201).

Asimismo, la región correspondiente a 389-423 presenta rangos altos de antigenicidad (202). Es posible que el resultado obtenido se deba al uso de un sistema de expresión procariota, al expresar en un sistema procariota no se puede obtener las modificaciones postraduccionales de la proteína Env como por ejemplo obtener glicosilaciones; es importante considerar que determinados carbohidratos en las glicoproteínas virales juegan un rol importante en la determinación de su estructura antigénica e inmunogénica (203, 204) por lo que la falta de estos carbohidratos en la proteína rEnv2 estarían influyendo en su reactividad con anticuerpos del suero.

Otra posibilidad, en cuanto a la baja reactividad observada en rEnv2 entre las muestras HTLV-1 positivas con diferentes manifestaciones clínicas, podría deberse a la tolerancia inmunológica; las secuencias presentes en gp21 se conservan entre secuencias de diferentes células humanas, se ha reportado secuencias retrovirales endógenas conservadas en el hígado y bazo fetal, así como la placenta que presentan parte de la secuencia de gp21 conservada. (205) Estas secuencias probablemente derivan de genes endógenos retrovirales integrados en el genoma humano que se expresaron en temprana edad y que probablemente indujo tolerancia (205) por lo que posiblemente no estaría presentando reactividad con rEnv2.

En el caso de rEnv2, se obtuvo una especificidad del 68%, las muestras HTLV-1 negativas que presentaron reactividad con rEnv2, es posible que se deba a que se encuentra la secuencia gp21 conservada en muchos retrovirus por lo que la reactividad en estas muestras se deba a una reacción cruzada con otros retrovirus, o cabe la posibilidad de que también se trate de anticuerpos producidos en respuesta a una secuencia de retrovirus endógeno (206).

Tanto en el caso de rEnv1 y rEnv2, es importante mencionar la existencia de reactividad cruzada incompleta entre sueros de diferentes individuos con diferentes cepas; por ejemplo se ha reportado que existe neutralización por

anticuerpos incompleta entre sueros de individuos con un subtipo Cosmopolita y uno de subtipo Melanesia (207). Así como también se ha observado lo mismo entre subtipos Cosmopolita que difieren a nivel de nucleótido en un 3-5% (208). Esto indica que aun el genoma de HTLV-1 muestre pocas variaciones en su secuencia de aminoácidos de gp46 y gp21, esos pequeños cambios podrían modificar la estructura y/o la antigenicidad de los epítopes (209) y subsecuentemente de los anticuerpos.

Es importante mencionar que una limitante del estudio es el no haber obtenido proteínas purificadas. Sin embargo, observamos una predisposición de la gran mayoría de las muestras HTLV-1 positivas con prueba confirmatoria de presentar reactividad positiva con las proteínas rGag270, rTax y rEnv1 (ver sección 7.1.4, tabla 13). Mientras que no se observa una diferencia entre la reactividad positiva frente a sueros HTLV-1 positivos y HTLV-1 negativos en cuanto al extracto conteniendo la proteína rEnv2 (ver sección 7.1.4, tabla 13). En el caso del extracto crudo conteniendo la proteína recombinante rGag429 se observa que reacciona tanto con sueros HTLV-1 positivos con prueba confirmatoria como con sueros negativos a HTLV-1 (ver sección 7.1.4, tabla 13).

Se ha descrito el uso de otros métodos de purificación además de la cromatografía de afinidad a níquel en el caso de proteínas recombinantes con colas de histidina con bajos niveles de expresión (210, 211) como en nuestro caso. Por lo que se recomienda la purificación de las proteínas rGag270, rTax y rEnv1 con otros métodos además de la cromatografía de afinidad a níquel y su posterior análisis con el panel de sueros.

9. Conclusiones

- Los genes *tax*, *gag* y *env* de HTLV-1 se encuentran conservados en nuestro país.
- Las proteínas recombinantes de HTLV-1 producidas no se unen a la columna de cromatografía de afinidad a níquel por lo que no es posible su purificación mediante este método.
- El uso de los extractos crudos conteniendo las proteínas recombinantes rGag270, rTax y rEnv1; siendo los resultados de sensibilidad del 100%,97% y 87%, respectivamente; presentan menos del 15% de falsos negativos.
- El extracto crudo conteniendo la proteína recombinante rGag429 presentó una especificidad del 48% en el Western Blot, lo que nos indica que tanto los sueros HTLV-1 positivos con prueba confirmatoria como los sueros negativos a HTLV-1 reaccionan con el extracto crudo conteniendo la proteína recombinante rGag429.

10. Recomendaciones

- Se recomienda la purificación de las proteínas rTax153, rGag270 y rEnv1 y el análisis del valor diagnóstico de cada una de estas después de haber sido purificadas.

11. Bibliografía

1. Serio D. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2012. p. 1221-34.
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980;77(12):7415-9.
3. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Frontiers in microbiology. 2012;3.
4. Gotuzzo E, Verdonck K, González E, Cabada M. Virus Linfotrópico Humano de células T tipo 1 (HTLV-1): una infección endémica en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2004;21(4):253-60.
5. Coelho-dos-Reis JGA, Rocha RDR, Brito-Melo GEA, Ribas JG, Carneiro-Proietti ABdF, Catalan-Soares B. Evaluation of the performance of immunological parameters as indicators for clinical progression of chronic HTLV-1 infection. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007;40(1):29-36.
6. Gotuzzo Herencia E, González Lagos E, Verdonck Bosteels K, Mayer Arispe E, Ita Nagy F, Clark Leza D. Veinte años de investigación sobre HTLV-1 y sus complicaciones médicas en el Perú: Perspectivas generales. Acta Médica Peruana. 2010;27(3):196-203.
7. 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. International Journal of Infectious Diseases. 2014;19:46-52.
8. Osame M, Usuku K. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. The Lancet. 1986;327(8488):1031-2.
9. Marinho J, Galvao-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2005;40(5):625-8.
10. Gotuzzo E, Terashima A, Alvarez H, Tello R. Strongyloides stercoralis hyperinfection associated with human T cell lymphotropic virus type-1 infection in Peru. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999;60(1):146-9.
11. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene. 2005;24(39):6058-68.
12. Alva IE, Orellana ER, Blas MM, Bernabe-Ortiz A, Cotrina A, Chiappe M. HTLV-1 and-2 infections among 10 indigenous groups in the Peruvian Amazon. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2012;87(5):954-6.
13. Einsiedel L, Verdonck K, Gotuzzo E, Scheld M, Grayson L, Hughes M. Human T-lymphotropic virus 1: clinical aspects of a neglected infection among indigenous populations. Emerging infections. 2010;9:109-27.

14. Blas MM, Alva IE, García PJ, Cárcamo C, Montano SM, Mori N. High prevalence of human T-lymphotropic virus Infection in Indigenous Women from the Peruvian Amazon. *PloS one*. 2013;8:e73978.
15. Larson CJ, Taswell HF, editors. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) and blood transfusion. Mayo Clinic Proceedings; 1988: Elsevier.
16. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Annals of internal medicine*. 1989;111(7):555-60.
17. Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *Journal of Infectious Diseases*. 1986;154(5):851-7.
18. Chang YB, Kaidarova Z, Hindes D, Bravo M, Kiely N, Kamel H. Seroprevalence and demographic determinants of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 infections among first-time blood donors—United States, 2000–2009. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(4):523-31.
19. Okochi K, Sato H. Transmission of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I) through blood transfusion and its prevention. *AIDS research*. 1986;2:S157-61.
20. PRONAHEBAS. Procedimientos del Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre. PRONAHEBAS-Ministerio de Salud setiembre de. 1998.
21. Salcedo JFR, Valencia OR. La experiencia de Perú con un programa nacional de bancos de sangre. *Am J Public Health*. 2003;13(2/3):165Y71.
22. Romero Carranza HSA, Verónica Betzabé; Huarancca Sánchez, José ; González Lagos, Elsa; Gotuzzo Herencia, José. Análisis situacional de los procesos de atención de candidatos donantes de sangre seropositivos para HTLV-1 en establecimientos de salud del Perú.2008-2012. Tesis de grado-Medicina-Biblioteca Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2013.
23. Acuña GG, E y Gotuzzo, J. Conocimientos, actitudes y prácticas relacionadas con el diagnóstico y la prevención de transmisión de la infección por el virus linfotrópico de células humanas tipo 1(HTLV-1) en portadores adultos atendidos en un centro de referencia en Lima, Perú. Tesis de grado-Medicina-Biblioteca Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2012.
24. Kim B-M, Jeong M-S, Lee T-Y, Yoon BD, Sung HC. Rapid immunoassay to detect antibodies against human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) by the recombinant immunodominant antigens. *Biotechnology techniques*. 1999;13(8):555-8.
25. Salcedo TF, José. Mercado de sangre humana en el Perú. *Rev Fac Cien Ecón Univ Nac Mayor de San Marcos*. 2005;10(28):85-1.
26. ONUSIDA. Estimaciones sobre el VIH y el sida 2014 [02-05-2016]. Available from: <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/peru>.
27. Lal RB. Delineation of immunodominant epitopes of human T-lymphotropic virus types I and II and their usefulness in developing serologic assays for detection of antibodies to HTLV-I and HTLV-II. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1996;13:S170-S8.
28. Burbelo PD, Meoli E, Leahy HP, Graham J, Yao K, Oh U. Anti-HTLV antibody profiling reveals an antibody signature for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology*. 2008;5(1):1-11.

29. Kohakura M, Nakada K, Yonahara M, Komoda H, Imai J, Hinuma Y. Seroepidemiology of the human retrovirus (HTLV/ATLV) in Okinawa where adult T-cell leukemia is highly endemic. *Japanese Journal of Cancer Research GANN*. 1986;77(1):21-3.
30. Center CE. Public health implications of HTLV-1 in the Caribbean. *Wkly Epidemiol Rec*. 1990;65(9):63-5.
31. Nerurkar VR, Song K-J, Saitou N, Melland RR, Yanagihara R. Interfamilial and intrafamilial genomic diversity and molecular phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Virology*. 1993;196(2):506-13.
32. Saxinger W, Blattner W, Levine P, Clark J. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. *Science*. 1984;225(4669):1473-6.
33. Gotuzzo E, Arango C, de Queiroz-Campos A, Istúriz RE. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infectious disease clinics of North América*. 2000;14(1):211-39.
34. Gessain A, Cassar O. HTLV-1 world distribution and estimation of the number of asymptomatic infected carriers. *Retrovirology*. 2014;11(1):1.
35. ECDC ECfDPaC. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. Technical report. 2015; TQ-02-15-177-EN-N.
36. Matsubara F, Sagara Y, Kato Y, Harada K, Koizumi A, Haraguchi K. Detection of Antibodies to Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2 in Breast Milk from East Asian Women. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37(2):311-4.
37. Holmgren B, Aaby P, Jensen H, Larsen O, Da Silva Z, Lisse IM. Increased prevalence of retrovirus infections among older women in Africa. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1999;31(5):459-66.
38. Moreno-Carvalho O, Santos Jid, Di Credico G, Galvão-Castro B. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 1992;50(2):183-8.
39. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. The origin and diversity of human retroviruses. *AIDS reviews*. 2014;16(1):23.
40. Mahieux R, Chappey C, Georges-Courbot M-C, Dubreuil G, Mauclere P, Georges A. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *Journal of virology*. 1998;72(12):10316-22.
41. Paiva A, Casseb J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015;57(1):01-14.
42. Li H-C, Fujiyoshi T, Lou H, Yashiki S, Sonoda S, Cartier L. The presence of ancient human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA in an Andean mummy. *Nature medicine*. 1999;5(12):1428-32.
43. Suzuki Y, Gojobori T. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *Virus genes*. 1998;16(1):69-84.
44. Gessain A, Boeri E, Yanagihara R, Gallo R, Franchini G. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from melanesia: genetic and

- phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *Journal of virology*. 1993;67(2):1015-23.
45. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. 1981.
 46. Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*. 2005;2(1):16.
 47. Bazarbachi A, Suarez F, Fields P, Hermine O. How I treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2011;118(7):1736-45.
 48. Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 2010;50(1):1-8.
 49. Ilievska J, Bishop NE, Fisher PR, Annesley SJ. The roles of ESCRT proteins in healthy cells and in disease: INTECH Open Access Publisher; 2012.
 50. Gessain A, Jouannelle A, Escarmant P, Calender A, Schaffar-Deshayes L, De-Thé G. HTLV antibodies in patients with non-Hodgkin lymphomas in Martinique. *The Lancet*. 1984;323(8387):1183-4.
 51. Matsuzaki H, Asou N, Kawaguchi Y, Hata H, Yoshinaga T, Kinuwaki E. Human T-cell leukemia virus type 1 associated with small cell lung cancer. *Cancer*. 1990;66(8):1763-8.
 52. Kannian P, Green PL. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): molecular biology and oncogenesis. *Viruses*. 2010;2(9):2037-77.
 53. Starkebaum G, Kalyanaraman V, Kidd P, Loughran T, Kadin M, Singer J. Serum reactivity to human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I proteins in patients with large granular lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 1987;329(8533):596-9.
 54. Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K, Watanabe T, Mori S, Tajima K. HTLV-I and uveitis. *The Lancet*. 1992;339(8801):1110.
 55. Nishioka K, Maruyama I, Sato K, Kitajima I, Nakajima Y, Osame M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *The Lancet*. 1989;333(8635):441.
 56. Morgan OS, Mora C, Rodgers-Johnson P, Char G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *The Lancet*. 1989;334(8673):1184-7.
 57. Fukazawa T, Hamada T, Hamada K, Yanagihara T, Tashiro K, Morikawa F. HTLV-1 associated myelopathy combined with chronic thyroiditis. *Journal of internal medicine*. 1991;230(1):89-90.
 58. Sugimoto M, Nakashima H, Watanabe S, Uyama E, Tanaka F, Ando M. T-lymphocyte alveolitis in HTLV-I-associated myelopathy. *The Lancet*. 1987;330(8569):1220.
 59. Nakagawa M, Izumo S. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *Journal of neurovirology*. 1995;1(1):50-61.
 60. Oh U, Jacobson S. Treatment of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: toward rational targeted therapy. *Neurologic clinics*. 2008;26(3):781-97.
 61. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and

- the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(7):3848-53.
62. Sabouri AH, Saito M, Usuku K. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *Journal of general virology*. 2005;86(3):773-81.
 63. Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of infectious diseases*. 2002;186(7):932-9.
 64. Talledo M, Lopez G, Huyghe JR, Verdonck K, Aduai V, González E. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *Journal of medical virology*. 2010;82(3):460-6.
 65. Kuroda Y, Matsui M. Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology*. 1993;42(2):223-6.
 66. Tanaka T, Sekioka T, Usui M, Imashuku S. *Opportunistic Infections in Patients with HTLV-1 Infection*. 2015.
 67. Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Barfield A, Barnard AL. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *The Journal of Immunology*. 2004;172(3):1735-43.
 68. Yasunaga J-i, Sakai T, Nosaka K, Etoh K-i, Tamiya S, Koga S. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood*. 2001;97(10):3177-83.
 69. Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Maturano E, Sileoni S, Nates S. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2001;43(5):277-82.
 70. Zihlmann KF, de Alvarenga AT, Casseb J. Living invisible: HTLV-1-infected persons and the lack of care in public health. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1705.
 71. Gill PS, Harrington Jr W, Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(26):1744-8.
 72. Treviño A, Parra P, Bar-Magen T, Garrido C, de Mendoza C, Soriano V. Antiviral effect of raltegravir on HTLV-1 carriers. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011.
 73. Bittencourt AL, Sabino EC, Costa MC, Pedroso C, Moreira L. No evidence of vertical transmission of HTLV-I in bottle-fed children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002;44(2):63-5.
 74. Nyambi PN, Ville Y, Louwagie J, Bedjabaga I, Glowaczower E. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-

- I/II) in Gabon: a prospective follow-up of 4 years. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1996;12(2):187-92.
75. Kashiwagi K, Furusyo N, Nakashima H, Kubo N, Kinukawa N, Kashiwagi S. A decrease in mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Okinawa, Japan. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;70(2):158-63.
 76. Kinoshita K, Hino S, Amagaski T, Ikeda S, Yamada Y, Suzuyama J. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. *Gann= Gan*. 1984;75(2):103-5.
 77. Gotuzzo E, Moody J, Verdonck K, Cabada MM. Frequent HTLV-1 infection in the offspring of Peruvian women with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or strongyloidiasis. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2007;22(4):223-30.
 78. Montano S, Zunt J, Rodriguez L, Quispe I, Rodriguez C, Altamirano J. Human T cell lymphotropic virus type 1 infection and early neurologic development: a pilot study of 48 children. *Clinical infectious diseases*. 2004;39(7):1079-82.
 79. Kendall EA, González E, Espinoza I, Tipismana M, Verdonck K, Clark D. Early neurologic abnormalities associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in a cohort of Peruvian children. *The Journal of pediatrics*. 2009;155(5):700-6.
 80. Li H-C, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(7):1275-8.
 81. Yoshida M. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene*. 2005;24(39):5931-7.
 82. Zunt JR, Dezzutti CS, Montano SM, Thomas KK, Alarcón JO, Quijano E. Cervical shedding of human T cell lymphotropic virus type I is associated with cervicitis. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(11):1669-72.
 83. Roucoux DF, Wang B, Smith D. A Prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV)-I and HTLV-II. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(9):1490-7.
 84. Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014;47(3):265-74.
 85. Stuver SO, Taehibana N, Okayama A, Shioiri S, Tsunetoshi Y, Tsuda K. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;167(1):57-65.
 86. Hoshino H. Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. *Frontiers in microbiology*. 2012;3.
 87. Carr J, Hocking H, Li P, Burrell C. Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology*. 1999;265(2):319-29.

88. Yamamoto N, Okada M, Koyanagi Y, Kannagi M, Hinuma Y. Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science*. 1982;217(4561):737-9.
89. Maeda Y, Furukawa M, Takehara Y, Yoshimura K, Miyamoto K, Matsuura T. Prevalence of possible adult t-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: A nation-wide study. *International Journal of Cancer*. 1984;33(6):717-20.
90. Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. 2012.
91. Wattel E, Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1996;13:S92-S9.
92. Wattel E, Vartanian J-P, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of virology*. 1995;69(5):2863-8.
93. Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1–infected T-cell clones. *Blood*. 2011;117(11):3113-22.
94. Mortreux F, Gabet A-S, Wattel E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia*. 2003;17(1):26-38.
95. Capdepon S, Londos-Gagliardi D, Joubert M, Correze P, Lafon ME, Guillemain B. New insights in HTLV-I phylogeny by sequencing and analyzing the entire envelope gene. *AIDS Research & Human Retroviruses*. 2005;21(1):28-42.
96. Mansky LM. In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *Journal of virology*. 2000;74(20):9525-31.
97. Martins LP, Chenciner N, Wain-hobson S. Complex inpatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology*. 1992;191(2):837-45.
98. Gessain A, Pecon-Slattery J, Meertens L, Mahieux R. Origins of HTLV-1 in South America (letter 1). *Nature medicine*. 2000;6(3):232-.
99. Ohshima K, Kikuchi M. Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/lymphoma: clinicopathological features. *Cancer research*. 1991;51(17):4639-42.
100. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *The Lancet*. 1999;353(9168):1951-8.
101. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K-i. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1996;88(8):3065-73.
102. Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *International Journal of Cancer*. 2011;128(6):1335-43.
103. Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y. Fratricide among CD8+ T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity*. 2000;13(5):657-64.
104. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993;196(1):25-33.

105. MACATONIA SE, Cruickshank J, RUDGE P, KNIGHT SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS research and human retroviruses*. 1992;8(9):1699-706.
106. Hoxie JA, Matthews DM, Cines DB. Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(23):7591-5.
107. Kitajima I, Yamamoto K, Sato K, Nakajima Y, Nakajima T, Maruyama I. Detection of human T cell lymphotropic virus type I proviral DNA and its gene expression in synovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(4):1315.
108. Lehky TJ, Levin MC, Flerlage N, Jacobson S, Fox CH, Koenig S. Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Annals of neurology*. 1995;37(2):167-75.
109. Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of General Virology*. 2003;84(12):3177-89.
110. Nejmeddine M, Bangham CR. The HTLV-1 virological synapse. *Viruses*. 2010;2(7):1427-47.
111. Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham C. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PloS one*. 2008;3(5):e2251.
112. Bangham CR, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*. 2005;24(39):6035-46.
113. Rafatpanah H, Farid R, Golanbar G, Azad FJ. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2006;5(4):153-66.
114. Bangham CR. The immune response to HTLV-I. *Current opinion in immunology*. 2000;12(4):397-402.
115. Manns A, Murphy EL, Wilks R, Haynes G, Figueroa JP, Hanchard B. Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. *Blood*. 1991;77(4):896-905.
116. Enose-Akahata Y, Abrams A, Massoud R, Bialuk I, Johnson KR, Green PL. Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. 2013.
117. Burbelo PD, Meoli E, Leahy HP, Graham J, Yao K, Oh U. Anti-HTLV antibody profiling reveals an antibody signature for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology*. 2008;5(1):96.
118. Enose-Akahata Y, Abrams A, Johnson KR, Maloney EM, Jacobson S. Quantitative differences in HTLV-I antibody responses: classification and relative risk assessment for asymptomatic carriers and ATL and HAM/TSP patients from Jamaica. *Blood*. 2012;119(12):2829-36.

119. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*. 1995;155(3):1151-64.
120. Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4+ CD25+ regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *British journal of haematology*. 2004;126(1):81-4.
121. Yamano Y, Takenouchi N, Li H-C, Tomaru U, Yao K, Grant CW. Virus-induced dysfunction of CD4+ CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1361-8.
122. Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Research*. 2004;64(1):391-9.
123. Bangham CR, Cook LB, Melamed A, editors. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Seminars in cancer biology*; 2014: Elsevier.
124. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Urano T. The Tax protein of HTLV-1 promotes oncogenesis in not only immature T cells but also mature T cells. *Nature medicine*. 2007;13(5):527-8.
125. Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995;86(10):3619-39.
126. Jones KS, Lambert S, Bouttier M. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses*. 2011;3(6):794-810.
127. Derse D, Heidecker G. Forced Entry--or Does HTLV-I Have the Key? *Science*. 2003;299(5613):1670-1.
128. Gross C, Thoma-Kress AK. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*. 2016;8(3):74.
129. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(10):2731-9.
130. Van Dooren S, Pybus OG, Salemi M, Liu H-F, Goubau P. The low evolutionary rate of human T-cell lymphotropic virus type-1 confirmed by analysis of vertical transmission chains. *Molecular biology and evolution*. 2004;21(3):603-11.
131. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*; 1989.
132. QIAexpressionist A. *A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins*. Qiagen p1-125. 2002.
133. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(9):4350-4.

134. Zhou X-H, McClish DK, Obuchowski NA. Statistical methods in diagnostic medicine: John Wiley & Sons; 2009.
135. Hsieh F, Turnbull BW. Nonparametric and semiparametric estimation of the receiver operating characteristic curve. *The annals of statistics*. 1996;24(1):25-40.
136. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983;148(3):839-43.
137. Mehdi T. Kernel smoothing for ROC curve and estimation for thyroid stimulating hormone. *International Journal of Public Health Research*. 2011:239-42.
138. Renjifo B, Chou K, Ramirez LS, Vallejo FG, Essex M. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) molecular genotypes and disease outcome. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1996;13:S146-S53.
139. Miyazato P, Matsuo M, Katsuya H, Satou Y. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanisms Affecting HTLV-1 Provirus. *Viruses*. 2016;8(6):171.
140. Hiramatsu K, Yoshikura H. Frequent partial deletion of human adult T-cell leukemia virus type I proviruses in experimental transmission: pattern and possible implication. *Journal of virology*. 1986;58(2):508-12.
141. Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP, Matutes E, Weiss RA. Chimeric matrix proteins encoded by defective proviruses with large internal deletions in human T-cell leukemia virus type 1-infected humans. *Journal of virology*. 2000;74(9):3933-40.
142. Altshuler ML. PCR troubleshooting: The essential guide: Horizon Scientific Press; 2006.
143. Kinoshita T, Tsujimoto A, Shimotohno K. Sequence variations in Itr and env regions of HTLV-I do not discriminate between the virus from patients with HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. *International journal of cancer*. 1991;47(4):491-5.
144. Komurian F, Pelloquin F. In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *Journal of virology*. 1991;65(7):3770-8.
145. Neto WK, Da-Costa AC, de Oliveira AS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino EC. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Virology journal*. 2011;8(1):535.
146. Giam C-Z, Semmes OJ. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma—A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses*. 2016;8(6):161.
147. Sherman MP, Dube S, Spicer TP, Kane TD. Sequence analysis of an immunogenic and neutralizing domain of the human T-cell lymphoma/leukemia virus type I gp46 surface membrane protein among various primate T-cell lymphoma/leukemia virus isolates including those from a patient with both HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. *Cancer research*. 1993;53(24):6067-73.
148. Morales AGN. The Peruvian migration phenomenon. Gender and Development Program, Centro de Asesoría Laboral del Perú

<http://www.caritas-europa.org/module/FileLib/Naranjopanel1> pdf#
search='peru+ population+ migration'(cited 30 September 2013). 2007.

149. Nam SH, Kidokoro M, Shida H, Hatanaka M. Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease. *Journal of virology*. 1988;62(10):3718-28.
150. Wagner S, Klepsch MM, Schlegel S, Appel A. Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(38):14371-6.
151. Gubellini F, Verdon G, Karpowich NK, Luff JD. Physiological response to membrane protein overexpression in E. coli. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(10):M111. 007930.
152. Schlegel S, Klepsch M, Gialama D, Wickström D. Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microbial biotechnology*. 2010;3(4):403-11.
153. Schlegel S, Löfblom J, Lee C, Hjelm A. Optimizing membrane protein overexpression in the Escherichia coli strain Lemo21 (DE3). *Journal of molecular biology*. 2012;423(4):648-59.
154. Kiyokawa T, Yoshikura H, Hattori S, Seiki M, Yoshida M. Envelope proteins of human T-cell leukemia virus: expression in Escherichia coli and its application to studies of env gene functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(19):6202-6.
155. Tetsuro K, Seisuke H, Mitsuaki Y, Tadatsugu T. Expression of human T-cell leukemia virus type I envelope protein in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*. 1986;44(2):337-40.
156. Samuel KP, Lautenberger JA, Jorcyk CL, Josephs S, Wong-Staal F, Papas TS. Diagnostic potential for human malignancies of bacterially produced HTLV-I envelope protein. *Science*. 1984;226(4678):1094-7.
157. Arp J, Ford C, Palker T, King E, Dekaban G. Expression and immunogenicity of the entire human T cell leukaemia virus type I envelope protein produced in a baculovirus system. *Journal of general virology*. 1993;74(2):211-22.
158. Arp J, LeVatte M, Rowe J, Perkins S, King E, Leystra-Lantz C. A source of glycosylated human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope protein: expression of gp46 by the vaccinia virus/T7 polymerase system. *Journal of virology*. 1996;70(11):7349-59.
159. Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular biology reports*. 1993;18(3):223-30.
160. Dong XY, Feng XD, Sun Y. His-tagged protein purification by metal-chelate affinity extraction with nickel-chelate reverse micelles. *Biotechnology progress*. 2010;26(4):1088-94.
161. Debeljak N, Feldman L, Davis KL, Komel R, Sytkowski AJ. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical biochemistry*. 2006;359(2):216-23.
162. Zurita S, Costa C, Watts D, Indacochea S, Campos P, Sanchez J. Prevalence of human retroviral infection in Quillabamba and Cuzco, Peru: a new endemic area for human T cell lymphotropic virus type 1. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997;56(5):561-5.
163. Magdeldin S, Moser A. Affinity chromatography: Principles and applications. S Magdeldin, InTech, Croatia. 2012:1-28.

164. Lykkemark S, Mandrup OA, Friis NA, Kristensen P, editors. Degradation of C-terminal tag sequences on domain antibodies purified from *E. coli* supernatant. *Mabs*; 2014: Taylor & Francis.
165. de Souza JG, da Fonseca FG, Martins ML, Martins CPS, de Carvalho LD, Coelho-dos-Reis JGA. Anti-Tax antibody levels in asymptomatic carriers, oligosymptomatic carriers, patients with rheumatologic disease or with HAM/TSP do not correlate with HTLV-1 proviral load. *Journal of Clinical Virology*. 2011;50(1):13-8.
166. Boxus M, Twizere J-C, Legros S, Dewulf J-F, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 tax interactome. *Retrovirology*. 2008;5(1):76.
167. Kamihira S, Toriya K, Amagasaki T, Momita S. Antibodies against p40tax Gene Product of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I) under Various Conditions of HTLV-I Infection. *Japanese journal of cancer research*. 1989;80(11):1066-71.
168. Lal RB, Giam C-Z, Coligan JE, Rudolph DL. Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Journal of Infectious Diseases*. 1994;169(3):496-503.
169. Gessain A, Caudie C, Gout O, Vernant J-C, Maurs L, Giordano C. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *Journal of Infectious Diseases*. 1988;157(6):1226-34.
170. Akimoto M, Kozako T, Sawada T, Matsushita K, Ozaki A, Hamada H. Anti-HTLV-1 tax antibody and tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. *Journal of medical virology*. 2007;79(7):977-86.
171. Levin MC, Lee SM, Morcos Y, Brady J, Stuart J. Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(10):1514-7.
172. Mager DL, Freeman JD. Human endogenous retroviruslike genome with type C pol sequences and gag sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *Journal of virology*. 1987;61(12):4060-6.
173. Maucière P, Le Hesran J-Y, Mahieux R, Salla R. Demographic, ethnic, and geographic differences between human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I-seropositive carriers and persons with HTLV-I Gag-indeterminate Western blots in Central Africa. *Journal of Infectious Diseases*. 1997;176(2):505-9.
174. Brookes S, Pandolfino Y, Mitchell T, Venables P. The immune response to and expression of cross-reactive retroviral gag sequences in autoimmune disease. *Rheumatology*. 1992;31(11):735-42.
175. Perl A, Rosenblatt JD, Chen IS. Detection and cloning of new HTLV-related endogenous sequences in man. *Nucleic acids research*. 1989;17(17):6841-54.
176. Perl A, Isaacs CM, Eddy RL, Byers MG, Sait SN, Shows TB. The human T-cell leukemia virus-related endogenous sequence (HRES1) is located on chromosome 1 at q42. *Genomics*. 1991;11(4):1172-3.

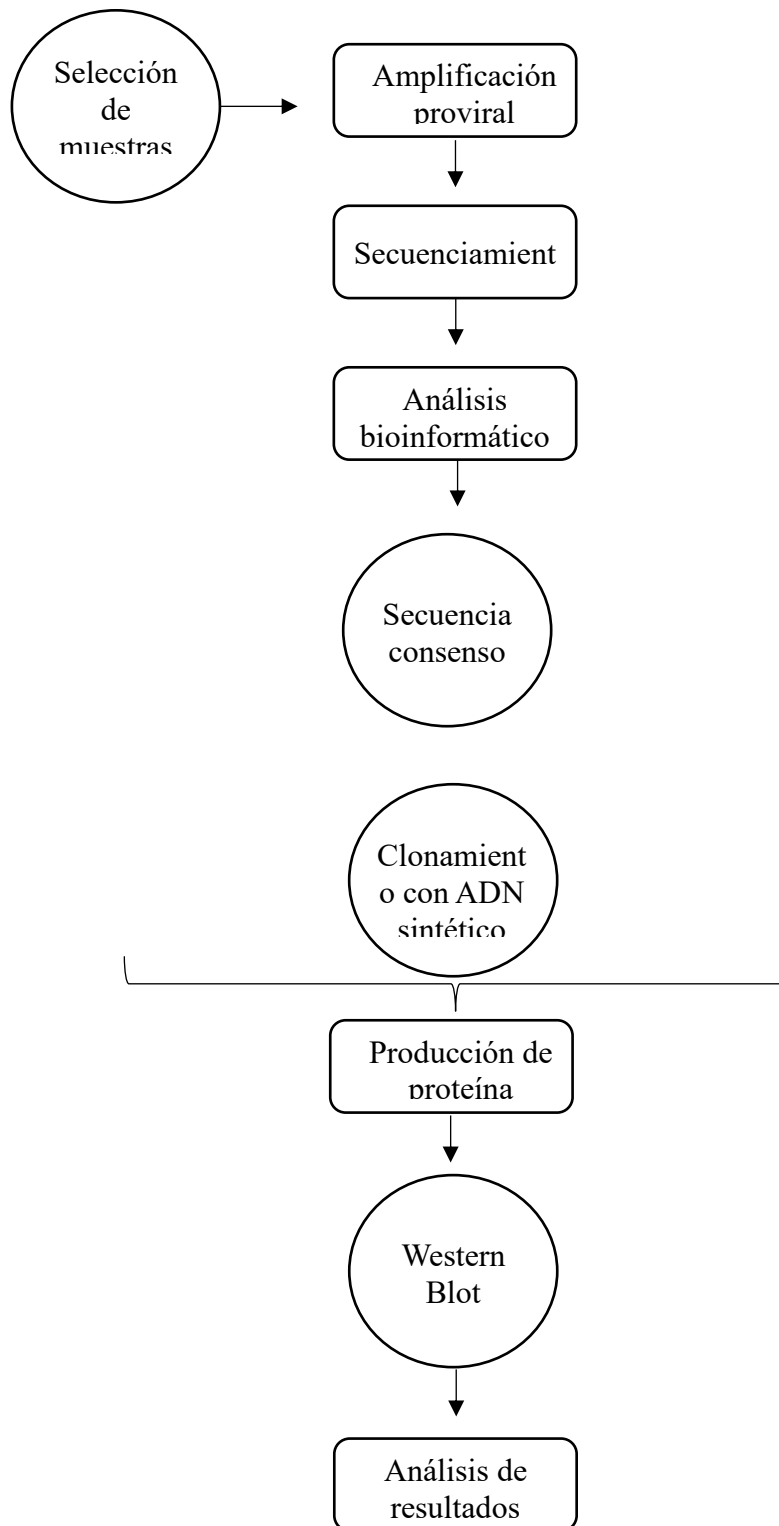
177. Banki K, Maceda J, Hurley E, Ablonczy E, Mattson D, Szegedy L. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: a possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(5):1939-43.
178. Tsao KC, Chen GW, Huang CG, Huang YL, Lin JY, Keng MC. False positive antibody results against human T-cell lymphotropic virus in patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of medical virology*. 2005;77(3):331-6.
179. Sato A, Isaka Y, Morita F. Human sera from varicella-zoster virus (VZV) infections cross-react with human T cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-1 p19 gag protein. *Journal of general virology*. 1992;73(11):2969-73.
180. Carvalho S, Pombo-de-Oliveira M, Thuler L, Leite N, Santos A, Nogueira R. Cross-reactivity between Human T-cell Leukemia-Lymphoma Virus indeterminate Western Blot and Dengue Virus in individuals from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirol*. 1999;20(4).
181. Miyakoshi H, Sugimoto M, Igarashi H, Honda H, Fujino R, Mizukoshi M. Improvement of simultaneous detection of antibodies to Gag and envelope antigens of human T-lymphotropic virus type I by western immunoblot assay. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(10):2555-9.
182. Lal R, Rudolph D, Alpers M, Sulzer A, Shi Y, Lal A. Immunologic cross-reactivity between structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type I and the blood stage of *Plasmodium falciparum*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1994;1(1):5-10.
183. Porter KR, Hayes CG, Anthony RL, Solihin A. Mapping of a human T-lymphotropic virus type I gag protein epitope that cross-reacts with anti-*Plasmodium falciparum* antibodies. *Journal of medical virology*. 1995;45(4):469-74.
184. Renan MJ. Sequence homologies in the control regions of c-myc, c-fos, HTLV and the interleukin-2 receptor. *Cancer letters*. 1985;28(1):69-76.
185. Lal R, Rudolph D, Griffis K, Kitamura K, Honda M, Coligan J. Characterization of immunodominant epitopes of gag and pol gene-encoded proteins of human T-cell lymphotropic virus type I. *Journal of virology*. 1991;65(4):1870-6.
186. Doolittle R, Feng D-F, Johnson M, McClure M. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Quarterly Review of Biology*. 1989:1-30.
187. Nagy G, Ward J, Mosser DD, Koncz A. Regulation of CD4 expression via recycling by HRES-1/RAB4 controls susceptibility to HIV infection. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(45):34574-91.
188. Nagy K, Clapham P, Cheingsong-Popov R, Weiss RA. Human T-cell leukemia virus type I: Induction of syncytia and inhibition by patients' sera. *International Journal of Cancer*. 1983;32(3):321-8.
189. Palker TJ, Tanner ME, Scarce RM, Streilein RD, Clark M, Haynes B. Mapping of immunogenic regions of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope glycoproteins with env-encoded synthetic peptides and a monoclonal antibody to gp46. *The Journal of Immunology*. 1989;142(3):971-8.

190. Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Callebaut I, Dokh elar M-C. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1996;13:S85-S91.
191. Hunter E, Swanstrom R. Retrovirus envelope glycoproteins. *Retroviruses: Springer*; 1990. p. 187-253.
192. Pique C, Pham D, Tursz T, Dokh elar M-C. Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *Journal of virology*. 1992;66(2):906-13.
193. Marin MH, Pent on PC, Bocalandro YM, Pe a LP, Navarro JD, L pez LJG. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289(1):1-6.
194. Tallet B, Astier-Gin T, Moynet D, Londos-Gagliardi D, Guillemain B. Sequence variations in the amino- and carboxy-terminal parts of the surface envelope glycoprotein of HTLV type 1 induce specific neutralizing antibodies. *AIDS research and human retroviruses*. 2001;17(4):337-48.
195. Hadlock KG, Yang Q, Rowe J. Epitope mapping of human monoclonal antibodies recognizing conformational epitopes within HTLV type 1 gp46, employing HTLV type 1/2 envelope chimeras. *AIDS research and human retroviruses*. 2002;18(1):57-70.
196. Hadlock KG, Rowe J, Fong SK. The humoral immune response to human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope glycoprotein gp46 is directed primarily against conformational epitopes. *Journal of virology*. 1999;73(2):1205-12.
197. Baba E, Nakamura M, Tanaka Y, Kuroki M. Multiple neutralizing B-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) identified by human monoclonal antibodies. A basis for the design of an HTLV-1 peptide vaccine. *The Journal of Immunology*. 1993;151(2):1013-24.
198. Horal P, Hall WW, Svennerholm B, Lycke J. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(13):5754-8.
199. Pinon JD, Klasse P, Jassal SR. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of virology*. 2003;77(18):9922-30.
200. Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998;5(1):45-9.
201. Hadlock KG, Goh C, Bradshaw P. Delineation of an immunodominant and human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. *Blood*. 1995;86(4):1392-9.
202. Sundaram R, Beebe M, Kaumaya P. Structural and immunogenicity analysis of chimeric B-cell epitope constructs derived from the gp46 and gp21 subunits of the envelope glycoproteins of HTLV-1. *The Journal of peptide research*. 2004;63(2):132-40.

203. Bruck C, Rensonnet N, Portetelle D, Cleuter Y. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability. *Virology*. 1984;136(1):20-31.
204. Fenouillet E, Gluckman J-C. Effect of a glucosidase inhibitor on the bioactivity and immunoreactivity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Journal of general virology*. 1991;72(8):1919-26.
205. Kitze B, Usuku K, Yashiki S, Ijichi S. Intrathecal humoral immune response in HAM/TSP in relation to HLA haplotype analysis. *Acta neurologica scandinavica*. 1996;94(4):287-93.
206. Kitze B, Usuku K, Yamano Y, Yashiki S. Human CD4⁺ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) env gp21 restricted by HLA DRB1* 0101. *Clin Exp Immunol*. 1998;111:278-85.
207. Benson J, Tschachler E, Gessain A, Yanagihara R. Cross-neutralizing antibodies against cosmopolitan and Melanesian strains of human T cell leukemia/lymphotropic virus type I in sera from inhabitants of Africa and the Solomon Islands. *AIDS research and human retroviruses*. 1994;10(1):91-6.
208. Blanchard S, Astier-Gin T, Moynet D, Edouard E, Guillemain B. Different HTLV-I neutralization patterns among sera of patients infected with cosmopolitan HTLV-I. *Virology*. 1998;245(1):90-8.
209. Blanchard S, Astier-Gin T, Tallet B, Moynet D, Londos-Gagliardi D, Guillemain B. Amino acid changes at positions 173 and 187 in the human T-cell leukemia virus type 1 surface glycoprotein induce specific neutralizing antibodies. *Journal of virology*. 1999;73(11):9369-76.
210. Magnusdottir A, Johansson I, Dahlgren L-G, Nordlund P, Berglund H. Enabling IMAC purification of low abundance recombinant proteins from *E. coli* lysates. *Nature methods*. 2009;6(7):477-8.
211. Bornhorst JA, Falke JJ. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*. 2000;326:245-54.

Anexos

Anexo 1. Diagrama de flujo de Metodología



Anexo 2. Tablas de contingencia-Proteínas recombinantes

Tabla 15. Tabla de contingencia de rGag429

rGag429	ELISA/PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	31	13	44
Negativo	0	12	12
Total	31	25	56

Tabla 16. Tabla de contingencia de rGag270

rGag270	ELISA/PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	31	5	36
Negativo	0	20	20
Total	31	25	56

Tabla 17. Tabla de contingencia de rTax153

rTax	ELISA/PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	30	7	37
Negativo	1	18	19
Total	31	25	56

Tabla 18. Tabla de contingencia de rEnv1

rEnv1	ELISA/PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	27	3	30
Negativo	4	22	26
Total	31	25	56

Tabla 19. Tabla de contingencia de rEnv2

rEnv2	ELISA/PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	8	14
Negativo	25	17	42
Total	31	25	56