



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA EN  
PACIENTES COINFECTADOS CON HTLV-1 Y STRONGYLOIDES STERCORALIS, Y  
PACIENTES ÚNICAMENTE INFECTADOS CON HTLV-1

PD-1 AND PD-L1 EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD T LYMPHOCYTES IN  
PATIENTS COINFECTED WITH HTLV-1 AND STRONGYLOIDES STERCORALIS,  
AND PATIENTS UNIQUELY INFECTED WITH HTLV-1

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

AUTORES

SEBASTIAN ARIEL GUTIERREZ CASTILLO

RODRIGO GONZALO MEDINA PIZARRO

ASESOR

MARTIN MONTES DELGADO

CO-ASESOR

CAROLINA DE LA FLOR PUCCINELLI

LIMA – PERÚ

2026



## **JURADO**

Presidente: DRA. CORALITH MARLINDA GARCIA APAC  
Vocal: DRA. FIORELLA DEL CARMEN KRAPP LOPEZ  
Secretaria: DRA. OMayra JANNET CHINCHA LINO

Fecha de Sustentación: 14 de enero del 2026

Calificación: Aprobado con Honores

## **ASESORES DE TESIS**

### **ASESOR**

**DR. MARTIN MONTES DELGADO**

Especialista en Infectología, Enfermedades Tropicales e Inmunología

Departamento del Área Pre Clínica

ORCID: 0000-0002-7427-347X

### **CO-ASESOR**

**DRA. CAROLINA DE LA FLOR PUCCINELLI**

Especialista en Infectología y Enfermedades Tropicales

Departamento del Área Clínica

ORCID: 0000-0002-2840-9970

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que viven con el virus humano linfotrópico de células T, especialmente a aquellos que, a pesar de las adversidades impuestas por esta condición, decidieron voluntariamente participar en este estudio con la esperanza de ayudar al desarrollo de conocimiento científico en búsqueda de mejores condiciones de salud para futuros pacientes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestros asesores, por sus consejos y enseñanzas impartidas en el desarrollo de este trabajo y durante nuestra formación profesional. También, a nuestras familias por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera universitaria.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente proyecto fue financiado en parte por el fondo de apoyo a la investigación Francisco Tejada y Semiramis Reátegui otorgado en septiembre del 2022.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

# DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	GUTIERREZ CASTILLO SEBASTIAN ARIEL
2.	MEDINA PIZARRO RODRIGO GONZALO

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA**, autores del trabajo titulado: **EXPRESIÓN DE PD-1 Y PD-L1 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES COINFECTADOS CON HTLV-1 Y STRONGYLOIDES STERCORALIS, Y PACIENTES ÚNICAMENTE INFECTADOS CON HTLV-1** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	MONTES DELGADO MARTIN	MEDICINA	ASESOR
2.	DE LA FLOR PUCCINELLI CAROLINA	MEDICINA	CO-ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **22 %**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **trn:oid:::1:3462791031**; fecha de entrega: **22-01-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 22 de enero del 2026.**

Firma del asesor  
N° DNI: 06663624  
ORCID: 0000-0002-7427-347X

Firma del Co-asesor  
N° DNI: 43869849  
ORCID: 0000-0002-2840-9970



## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
II. Objetivos	9
III. Materiales y métodos	10
IV. Resultados	15
V. Discusión	20
VI. Conclusiones	28
VII. Referencias bibliográficas	29
VIII. Tablas, gráficas y figuras	31
Anexos	

## RESUMEN

**Antecedentes:** La leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL), tiene una expresión de PD-1 y PD-L1 aumentada, y la positividad de PD-L1 en sus células neoplásicas implica un peor pronóstico. En pacientes con infección por HTLV-1, la coinfección por *Strongyloides stercoralis* (SS) puede acelerar la progresión hacia ATL. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) infectados por HTLV-1 expresan CADM1 y, a medida que se transforman, tienden a perder CD7. Además, se ha descrito una expansión de linfocitos T reguladores que podrían suprimir la inmunidad antitumoral mediante la vía PD-1/PD-L1 y favorecer la progresión a ATL. **Objetivos:** Comparar la expresión de PD-1 y PD-L1 en LTCD4<sup>+</sup> y LTCD8<sup>+</sup> entre cuatro grupos: (1) pacientes con ATL, (2) coinfectados por HTLV-1 y SS, (3) infectados por HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis y (4) sin dicho antecedente. Además, evaluar la expresión de CADM1 y CD7 en LTCD4<sup>+</sup> en dichos grupos y según la presentación clínica del HTLV-1 (ATL, paraparesia espástica tropical, estrongiloidiasis activa o estado asintomático), y analizar la correlación entre CADM1, la carga proviral de HTLV-1 y la carga parasitaria de SS. **Materiales y métodos:** Estudio piloto observacional, analítico y transversal. Se evaluó la expresión de PD-1, PD-L1, CADM1 y CD7 en LTCD4<sup>+</sup> mediante citometría de flujo en PBMCs criopreservadas. **Resultados:** No se observaron diferencias significativas en la expresión de PD-1 o PD-L1 entre los grupos. La expresión de CADM1 y la pérdida de CD7 fueron similares independientemente del antecedente de estrongiloidiasis, lo que sugiere que no existiría un efecto inmunomodulador residual por parte del parásito. **Conclusiones:** Los marcadores PD-1 y PD-L1 no parecen desempeñar un papel central en la interacción inmunológica entre HTLV-1 y *S. stercoralis* que acelera la progresión hacia ATL.

**Palabras clave:** ATL, PD-1, PD-L1, HTLV-1, *Strongyloides stercoralis*.

## ABSTRACT

**Background:** In adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), PD-1 and PD-L1 are upregulated, and PD-L1 positivity in malignant cells correlates with poorer prognosis. In HTLV-1–infected patients, *Strongyloides stercoralis* (SS) coinfection may hasten ATL development. HTLV-1–infected CD4<sup>+</sup> T cells express CADM1 and lose CD7 expression during malignant transformation. Regulatory T-cell expansion in HTLV-1 infection may suppress antitumor immunity via the PD-1/PD-L1 pathway, contributing to ATL. **Objectives:** To compare PD-1 and PD-L1 expression in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells among four groups: (1) ATL, (2) HTLV-1+SS coinfection, (3) HTLV-1 with past strongyloidiasis, and (4) HTLV-1 without past strongyloidiasis. Also, we aim to assess CADM1 and CD7 expression in CD4<sup>+</sup> T cells by clinical form (ATL, TSP, active strongyloidiasis, or asymptomatic) and analyze correlations between CADM1, HTLV-1 proviral load, and SS burden. **Materials and methods:** Cross-sectional analytic pilot study. PD-1, PD-L1, CADM1, and CD7 were measured by flow cytometry in cryopreserved PBMCs. **Results:** PD-1 and PD-L1 expression did not differ among groups. CADM1 and CD7 patterns were similar regardless of prior strongyloidiasis, suggesting there would be no residual immunomodulatory effect from the parasite. **Conclusions:** PD-1 and PD-L1 unlikely play a major role in the HTLV-1 and SS interaction promoting ATL.

**Keywords:** ATL, PD-1, PD-L1, HTLV-1, *Strongyloides stercoralis*.

## I. INTRODUCCIÓN

### HTLV-1

El virus HTLV-1 es un retrovirus endémico de regiones tropicales y subtropicales, con un marcado tropismo por linfocitos T CD4+. Su transmisión ocurre de célula a célula mediante contacto directo. La transmisión entre individuos ocurre por contacto sexual, transfusiones y principalmente por lactancia materna.<sup>1</sup>

El virus HTLV-1 es capaz de inmortalizar a las células T CD4+ infectadas y promover su proliferación, eventualmente causando linfoma/leucemia de células T del adulto (ATL). Se ha observado que la carga proviral de HTLV-1 es mayor en ATL que en portadores sanos, siendo esta un posible marcador pronóstico para el desarrollo de ATL.<sup>2</sup> El periodo desde la infección hasta el desarrollo de ATL es prolongado, la edad promedio del diagnóstico es la década de los sesenta.<sup>3</sup> La ATL se clasifica en cuatro variantes clínicas: dos formas agresivas (aguda y linfomatosa) y dos formas no agresivas (crónica y latente). Diversos estudios muestran que las células malignas de la ATL tienden hacia un fenotipo de células T reguladoras (Tregs) caracterizado por una expresión incrementada de CD25 y FOXP3. Además, se sabe que la expresión de la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) está elevada en células T CD4+ infectadas con HTLV-1.<sup>4,5</sup> La expresión elevada de CADM1, junto con una baja expresión de CD7, se ha asociado a un mayor riesgo de progresión hacia ATL.<sup>6</sup>

Por otro lado, la paraparesia espástica tropical (PET) representa el polo opuesto del espectro clínico de la infección. Mientras en la ATL predomina un estado de inmunosupresión y evasión inmune, en PET se observa una respuesta inflamatoria

exacerbada mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y citocinas proinflamatorias, como IFN- $\gamma$ .<sup>7,8</sup> De esta forma, ATL y PET reflejan dos extremos del mismo espectro inmunopatológico del HTLV-1, donde el balance entre activación e inhibición inmunitaria determina el fenotipo clínico resultante.<sup>7,8</sup>

### **Coinfección HTLV-1 - Strongyloides stercoralis**

En Perú, se reportan casos de coinfección por HTLV-1 y *Strongyloides stercoralis* (SS), los cuales usualmente progresan hacia cuadros clínicos más severos de ambas infecciones. Existe una relación bidireccional entre ambos patógenos, en la cual uno facilita la infección y perpetuación del otro y viceversa.<sup>9</sup> Por un lado, el cuadro clínico de la estrongiloidiasis puede empeorar (hiperinfección) en condiciones de inmunosupresión como corticoterapia o coinfección con HTLV-1, agravando los síntomas gastrointestinales y respiratorios<sup>9</sup> y aumentando la carga parasitaria en heces.<sup>10</sup>

Por otro lado, se ha observado una asociación entre esta coinfección y un desarrollo acelerado de ATL, junto a una mayor carga proviral y población de Tregs.<sup>10</sup> Un mecanismo postulado para esta aceleración consiste en la proliferación de linfocitos Tregs aumentada y la inhibición que estos ejercen sobre la respuesta inmune.<sup>8</sup> Es preciso reconocer que normalmente los Tregs llevan a cabo la inhibición de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a través de puntos de control inmunológicos como el eje de la molécula de muerte programada 1 y su ligando (PD-1/PD-L1), entre otros. Adicionalmente, otros mecanismos propuestos para este desarrollo acelerado de ATL son la linfoproliferación viral y la translocación bacteriana podrían estar involucrados.<sup>10</sup>

### **Eje PD-1/PD-L1**

El eje PD-1/PD-L1 es un sistema molecular cuya función es la regulación de la respuesta inmune a través de la inhibición periférica de la respuesta adaptativa, principalmente de linfocitos T. PD-1 se acumula en el citoplasma de Tregs y luego es transportado hacia la superficie celular tras la activación de la señal del receptor de células T (TCR). La unión de PD-1 con su ligando PD-L1 altera la señalización TCR antígeno-específica, inactivando la célula T para prevenir una sobreactivación inmune potencialmente dañina. De la misma manera, los linfocitos T CD8+ y otros linfocitos T CD4+ también expresan PD-1 en su superficie, por lo que también son susceptibles a ser inhibidos al interactuar con PD-L1. Esta función es usada por las células tumorales para evadir la respuesta inmune, previniendo la muerte de estas. Es relevante mencionar que las células tumorales son capaces de inducir la expresión de PD-L1 en su superficie a través de diversos mecanismos.<sup>11</sup>

### **Puntos de control inmunológicos en ATL**

En el caso de ATL, el eje PD-1/PD-L1 expresado en las células malignas podría resultar en una mayor capacidad de evasión de la respuesta inmune antitumoral. Shimauchi et al. (2007)<sup>12</sup> observaron que la expresión de PD-1 fue significativamente mayor en linfocitos T CD4+ en pacientes con ATL a comparación con individuos sanos, pero no hubo diferencia en linfocitos T CD8+. Además, encontraron una mayor concentración de PD-1 en células neoplásicas y células no neoplásicas en pacientes ATL.<sup>12</sup> Asimismo, encontraron una mayor cantidad de linfocitos T CD4+ y una menor respuesta TCR en pacientes con ATL.<sup>12</sup>

Por otro lado, Miyoshi et al. (2016)<sup>13</sup> demostraron una correlación entre una mayor expresión de PD-L1 en células neoplásicas de biopsias de ganglios linfáticos y una peor tasa de supervivencia promedio (*overall survival*: OS) en pacientes ATL. La OS de pacientes con células neoplásicas PD-L1+ (nPD-L1+) fue casi la mitad de la OS de pacientes con células neoplásicas PD-L1- (nPD-L1-).<sup>13</sup> Además, reportaron que los pacientes nPD-L1+ poseían una mayor cantidad de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) PD-1+ en comparación con los pacientes nPD-L1-, manifestando una respuesta inmune modulada.<sup>13</sup> Asimismo, Takeuchi et al. (2020)<sup>14</sup> encontraron resultados similares a través de inmunohistoquímica al observar que una mayor expresión de PD-L1 en células neoplásicas está asociada con una peor OS.

También, en ambos estudios encontraron una correlación entre una mayor expresión de PD-L1 en células del microambiente (miPD-L1+) con una mejor OS.<sup>13,14</sup> Ambos explicaron este último fenómeno paradójico argumentando que la expresión de PD-L1 en células del microambiente refleja una adecuada respuesta inmune contra el tumor, ya que esta molécula y su receptor (PD-1) incrementan su expresión tras una activación exitosa de células inmunes, como un mecanismo de retroalimentación negativa.<sup>13,14</sup> Por lo tanto, los pacientes miPD-L1 tienen una mejor inmunovigilancia que permite controlar por más tiempo el tumor. Adicionalmente, encontraron una mayor cantidad de TILs PD-1+ en pacientes miPD-L1+ que en pacientes miPD-L1-, reforzando su explicación sobre la retroalimentación negativa (Miyoshi 2016; Takeuchi 2020).<sup>13,14</sup>

### **Bloqueo de PD-1 en ATL**

Dado el patrón de expresión de PD-1/PD-L1 observado en ATL, diversos estudios clínicos han evaluado el uso de anticuerpos monoclonales como nivolumab (anti-PD-1) como posible estrategia terapéutica. Rauch et al. (2019)<sup>15</sup> trataron dos pacientes con ATL no-agresivo y uno agresivo (agudo) con nivolumab. Los tres sufrieron una rápida progresión de la enfermedad tras la aplicación de una dosis de este fármaco biológico. Los autores propusieron cuatro mecanismos para esta rápida progresión de la ATL:

1. El bloqueo de PD-1 promueve la expresión de otros puntos de control inmunológicos (CTLA-4, IAG-3, OX40, ICOS, TIGIT y CD40) en células malignas como mecanismo de evasión inmune.
2. El bloqueo de PD-1 altera la expresión de factores de crecimiento, lo cual promovería el desarrollo de la ATL.
3. La unión de PD-L1 estromal (microambiente) a PD-1 en células leucémicas induce una respuesta supresora tumoral en el microambiente.
4. En pacientes con ATL no-agresivo (crónico o latente), solamente PD-1 se encarga de la inmunidad, por lo que su bloqueo podría eliminar un mecanismo de control tumoral.

Ishitsuka et. al. (2018)<sup>16</sup> trataron ocho pacientes con ATL agresivo, quienes habían recaído o no habían respondido a mogamulizumab (anti-CCR4). A diferencia de Rauch et al. (2019)<sup>15</sup>, no reportaron la misma progresión acelerada tras la infusión del nivolumab. La explicación para resultados opuestos entre los dos estudios puede recaer en el tipo de ATL (agresivo o no-agresivo) en los pacientes tratados y en el patrón de expresión de PD-L1 en células neoplásicas y en células del microambiente.

### **PD-1 en infección por *Strongyloides stercoralis***

Por otro lado, Rajamanickam et al. (2019)<sup>17</sup> estudiaron el efecto del bloqueo de CTLA-4 y PD-1 en la expresión de citoquinas de cada tipo de respuesta celular T CD4<sup>+</sup> en pacientes infectados con *SS* a través de citometría de flujo. Encontraron que el bloqueo de PD-1 está asociado con un incremento significativo de citoquinas T<sub>H1</sub> y T<sub>H17</sub> y un decremento en las producidas por los linajes T<sub>H2</sub> y T<sub>H9</sub>. Con esta inmunomodulación, se esperaría una respuesta T<sub>H1</sub> disminuida y una respuesta T<sub>H2</sub> aumentada, pudiendo así favorecer la progresión hacia ATL en caso de coinfección con HTLV-1. Así pues, el bloqueo de PD-1 favorecería la respuesta T<sub>H1</sub> antiviral. Sin embargo, la supresión de T<sub>H2</sub> contribuiría a una hiperinfección.

### **Hipótesis**

Algunos autores plantean que la progresión acelerada de ATL en la coinfección por HTLV-1 y *SS* está mediada por la expansión de Tregs, que suprimirían la respuesta inmune citotóxica contra linfocitos T CD4<sup>+</sup> infectados. Además, se ha asociado un incremento de la expresión de PD-1 y PD-L1 en pacientes con ATL y se ha evidenciado que una mayor expresión de PD-L1 en células neoplásicas se correlaciona con una peor tasa de supervivencia promedio. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual la expansión de linfocitos Tregs induciría la supresión de la respuesta antitumoral, que permitiría una progresión acelerada de la ATL en el contexto de la coinfección HTLV-*SS*, o el rol de PD-1/PD-L1.

Este estudio evaluó el papel de los puntos de control inmunológicos PD-1/PD-L1 en la coinfección HTLV-1 y *SS*, con el objetivo, a largo plazo, de identificar

mecanismos implicados en la progresión acelerada a ATL y proponer potenciales blancos terapéuticos. Postulamos que el incremento de PD-1 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, y el incremento de PD-L1 en linfocitos T CD4+ CADM1+/CD7- (linfocitos en progresión a células neoplásicas) inducen la progresión acelerada de ATL que se observa en la coinfección. Por lo tanto, se hipotetizó que la expresión del eje PD-1/PD-L1 en las subpoblaciones mencionadas de linfocitos T de sangre periférica sería mayor en pacientes coinfectados con HTLV-1 y SS en comparación a pacientes únicamente infectados con HTLV-1 con o sin infección previa por SS.

Por otro lado, también se buscó evaluar la expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4+ entre cuatro grupos de pacientes: (1) infectados con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis, (2) infectados con HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis, (3) coinfectados activamente con HTLV-1 y SS, y (4) pacientes con diagnóstico de ATL sin coinfección. Ello, para determinar si existe alguna diferencia en la cantidad de células infectadas por el retrovirus y en la cantidad de aquellas que se encuentran progresando hacia ATL. De tal manera, una mayor expresión de CADM1 y menor expresión de CD7 sería sugestivo de mayor infectividad y progresión hacia dicha malignidad. En este sentido, se exploró si los efectos inmunomoduladores de SS persisten tras el tratamiento y resolución clínica de la infección. Esto sería beneficioso para la consideración de medidas de salud pública que comprendan tratamientos profilácticos en zonas endémicas y/o poblaciones vulnerables.

En esta misma línea, resulta relevante analizar la expresión de moléculas como CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4+ en función de las distintas presentaciones clínicas de la infección por HTLV-1, tales como la PET, la ATL, la coinfección

activa con *SS* y el estado de portador asintomático. Estas condiciones representan diferentes puntos dentro del espectro inmunopatológico del HTLV-1, asociados a grados variables de activación, proliferación e inmunorregulación linfocitaria.

Por último, se evaluó la existencia de una correlación entre la carga proviral de HTLV-1 y la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+, ya que esto aumentaría la fiabilidad de emplear CADM1 como marcador de infectividad por dicho retrovirus. Asimismo, se buscó la existencia de correlación entre la carga parasitaria de *SS* y la expresión CADM1 en linfocitos T CD4+, así como con la carga proviral de HTLV-1. Ambos para determinar la correlación entre la severidad de ambas infecciones.

## II. OBJETIVOS

### **Objetivo primario:**

- Comparar la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y la expresión de PD-L1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> CADM1<sup>+</sup>/CD7<sup>-</sup> entre cuatro grupos de pacientes: (1) infectados con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis, (2) infectados con HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis, (3) coinfectados activamente con HTLV-1 y *SS*, y (4) pacientes con diagnóstico de ATL sin coinfección.

### **Objetivos secundarios:**

- Evaluar la expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los mismos cuatro grupos de pacientes definidos para el objetivo primario.
- Comparar la expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> entre pacientes con diferentes presentaciones clínicas de la infección por HTLV-1: ATL, PET, coinfección activa con *SS* y portadores asintomáticos.
- Evaluar la correlación entre la expresión de CADM1 y la carga proviral de HTLV-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
- Determinar la correlación entre la expresión de CADM1 y la carga parasitaria de *SS*.
- Evaluar la correlación entre la carga proviral de HTLV-1 y la carga parasitaria de *SS*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS:

**Diseño de estudio:** Estudio observacional, analítico y transversal.

**Muestra:** se analizaron 36 muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), obtenidas de la cohorte “El efecto de *Strongyloides stercoralis* en la progresión de la infección por HTLV-1”, recolectadas entre el 19 de marzo de 2018 y el 26 de marzo de 2024.

**Población blanco:** La población blanco incluyó pacientes con diagnóstico confirmado de HTLV-1, con o sin infección por *SS*, registrados en la base de datos del estudio SIDISI 101272.

**Población accesible:** La población accesible consistió en muestras criopreservadas de PBMCs almacenadas en el criobanco del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (UPCH, Lima, Perú).

**Criterios de inclusión de la muestra:** Edad entre 18 a 65 años, diagnóstico positivo para HTLV-1 (con inmunoensayo y carga proviral) y consentimiento informado aprobado por el Comité de Institucional de Ética en Investigación (CIEI).

**Criterios de exclusión de la muestra:** Pacientes en estado de gestación.

**Tipo de muestreo:** Por conveniencia y no probabilístico, se incluyeron las muestras de PBMCs de la primera visita de 36 individuos de la cohorte. Dentro de estas, se seleccionaron 6 individuos con coinfección de HTLV-1 y *SS*, 12 individuos con infección por HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis, 18 individuos con infección por HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis. Se reportaron 4 individuos con ATL, 3 sin antecedente de *SS* y 1 con antecedente de *SS*.

**Definición operacional de variables:** las variables fueron definidas de acuerdo a su tipo, escala de medición, definición operacional y la fuente de datos de donde se extrajeron. (Ver Anexo 1)

**Procedimientos y técnicas:** Las muestras fueron recuperadas del criobanco de nitrógeno líquido y sometidas a descriopreservación según el protocolo del laboratorio (ver Anexo 2). La viabilidad celular fue evaluada mediante microscopía con cámara de Neubauer. Aquellas con viabilidad menor al 90% fueron tratadas con el marcador de viabilidad Zombie Yellow™ (BioLegend), con emisión similar al fluorocromo Brilliant Violet 570™.

Posteriormente, se realizó la tinción de PBMCs con anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4, CD8, CD7, CADM1, PD-1 y PD-L1 del laboratorio BioLegend mediante el protocolo del laboratorio (Ver Anexo 2).

Una vez completado el tiempo de incubación de los anticuerpos, se procedió con el análisis de las muestras mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II. Todos los procesos laborales descritos fueron realizados por los investigadores bajo supervisión y tras recibir una capacitación por parte de los asesores y el personal del laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt.

**Instrumento de recolección de datos: (Ver Anexo 3)**

El análisis de la información de las 36 muestras de PBMCs se realizó en el programa Flowjo\_v10.10.0. Se realizaron las separaciones poblacionales, inicialmente enfrentando *forward-scatter* contra *side-scatter* y se seleccionaron los linfocitos. A continuación, se separaron según viabilidad, seleccionando aquellos linfocitos que no

presentaron positividad para el marcador Zombie Yellow™. Después, se seleccionaron los linfocitos viables que presentaron positividad para CD3, diferenciado mediante un histograma. Una vez seleccionados los linfocitos T (CD3+), se separaron según expresión de CD4 y CD8 en un panel. Posteriormente, se evaluó la expresión de PD-1 en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Por último, se seleccionaron los linfocitos T CD4+ y se evaluó en panel la expresión de CADM1 y CD7, para poder determinar aquellas que presentaban positividad para CADM1 y negatividad para CD7 (linfocitos T CD4+ CADM1+ CD7-). Dentro de esta subpoblación, se evaluó la expresión de PD-L1. Para determinar la positividad para determinado marcador en las subpoblaciones, se tomó en cuenta el porcentaje de células positivas para dicho marcador.

Por otro lado, la carga proviral de HTLV-1 fue obtenida de la base de datos de la cohorte mencionada previamente, en la cual se utilizó reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). (Ver Anexo 2).

Finalmente, los valores de la carga parasitaria de SS en los pacientes (método de Baermann), fue extraído de las historias clínicas de los pacientes pertenecientes a la cohorte del estudio “El efecto de *Strongyloides stercoralis* en la progresión de la infección por HTLV-1”

#### **Manejo de datos:**

- **Base de datos:** A partir de los datos obtenidos de la ficha de recolección, se creó una base de datos en formato hoja de cálculo de Microsoft Excel.
- **Validación de datos:** Se verificó la precisión y confiabilidad de los datos en la hoja de cálculo de Microsoft Excel.

- **Edición de datos:** Los datos fueron codificados y posteriormente transferidos a un software de análisis estadístico mediante software STATA versión 19.

### **Financiamiento:**

El financiamiento de este proyecto fue gracias al monto otorgado al ganar el concurso de la Beca Francisco Tejada y Semiramis Reátegui, organizada por la Unidad de Investigación de la UPCH el 2022. Se muestran los precios de los reactivos para la citometría (**Ver Anexo 4**). El resto de materiales fueron donados por el laboratorio de Inmunología del IMT-AvH.

### **Aspectos Éticos:**

El presente trabajo de investigación fue presentado al CIEI de la UPCH previo a su ejecución. Los nombres de los participantes no están incluidos en ninguna base de datos y el intercambio de información entre los protocolos de estudio y los análisis se realizó mediante información codificada. Toda la información obtenida fue trabajada en los equipos del IMT-AvH de la UPCH, a la cual solo se pudo acceder usando los códigos personales de los investigadores. Al ser un subestudio del citado anteriormente (SIDISI 101272) el consentimiento informado ya había sido firmado por el paciente al momento del reclutamiento.

### **Plan de Análisis:**

- **Estadística descriptiva:** las variables serán presentadas según la mediana, rangos intercuartiles y valores máximos y mínimos.
- **Estadística inferencial:** en primer lugar, cada variable fue analizada según la prueba de asimetría y curtosis para determinar la distribución de los datos. A partir de ello, con la mayoría de las variables se obtuvieron valores de  $p < 0,05$

por lo que se rechazó la hipótesis nula de normalidad y se establecieron como variables que siguen una distribución no normal. Para las variables que presentaron un valor de  $p \geq 0,05$ , el número de eventos fue considerado bajo para asumir normalidad en estas. Por ello, se decidió tratarlas como variables que siguen una distribución no normal. En consecuencia, al realizar la comparativa entre grupos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En caso, se encontrase una diferencia significativa al menos entre dos grupos ( $p < 0,05$ ), se realizaba la prueba de Mann-Whitney para determinar la existencia de una diferencia significativa entre dos grupos. Esta se aplicó para todas las combinaciones posibles entre dos grupos.

- Por otro lado, para analizar la correlación entre dos variables, primero se determinó la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk. De la misma manera, se obtuvo que la mayoría presentaban una distribución no normal. Por consiguiente, se utilizó la prueba de Spearman para determinar el coeficiente de correlación.

## IV. RESULTADOS

### Descripción de la población de estudio

Se analizaron 36 muestras mediante citometría de flujo. La **Tabla 1** resume las características epidemiológicas de los participantes. No se encontraron diferencias significativas entre grupos respecto a la edad ( $p = 0,508$ ), sexo ( $p = 0,132$ ), ocupación ( $p = 0,773$ ), comorbilidades metabólicas ( $p = 0,227$ ) o autoinmunes ( $p = 0,477$ ), ni en el lugar de nacimiento ( $p = 0,563$ ), procedencia ( $p = 0,071$ ), o antecedentes familiares de HTLV-1 ( $p = 0,265$ ) o de SS ( $p = 0,140$ ). Tampoco se observaron diferencias en la distribución del estado de infección ( $p = 0,327$ ).

### Expresión de PD-1 y PD-L1 linfocitos T

El porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan PD-1 según estado infeccioso (infección por HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis, infección por HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis, coinfección con HTLV-1 y SS, y ATL), no presentó diferencia estadísticamente significativa entre las medianas (0,49% vs. 0,6% vs. 0,97% vs. 0,61%;  $p = 0,214$ ,  $X^2: 4,48$ ) (**Tabla 2 y Gráfica 1A**).

De similar manera, no hubo diferencia en la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ entre grupos (0,14% vs. 0,06% vs. 0,07% vs. 0,06%;  $p = 0,79$ ,  $X^2 = 1,07$ ) (**Tabla 2 y Gráfica 1B**).

Por otro lado, la expresión de PD-L1 en linfocitos T CD4+ CADM1+/CD7- tampoco mostró diferencias significativas entre grupos según estado infeccioso (0% vs. 0,17% vs. 0,1% vs. 0,19%;  $p = 0,74$ ,  $X^2 = 1,24$ ) (**Tabla 2 y Gráfica 1C**).

### **Expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4+ según estado infeccioso**

El porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 mostró diferencias significativas entre grupos según estado de infección (5,74% vs. 7,11% vs. 22,15% vs. 60,3%;  $p = 0,0036$ ,  $X^2 = 13,54$ ) (**Tabla 3 y Gráfica 2A**). Las comparaciones *post hoc* revelaron diferencias significativas entre:

- Coinfectados vs. pacientes con HTLV-1 y antecedente de estrongiloidiasis (22,15% vs. 7,11%;  $p = 0,0145$ ), siendo mayor en el primero.
- Coinfectados vs. pacientes con HTLV-1 y sin antecedente de estrongiloidiasis (22,15% vs. 5,74%;  $p = 0,0233$ ), siendo mayor en el primero.

Por contraparte, no se observaron diferencias significativas entre coinfectados y pacientes con ATL (22,15% vs. 60,3%;  $p = 0,1714$ ). Tampoco hubo diferencia entre pacientes con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis contra aquellos sin antecedente de esta parasitosis (7,11% vs. 5,74%;  $p = 0,7988$ ), pero sí se encontró diferencia entre:

- Pacientes con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis vs. pacientes con ATL (7,11% vs. 60,3%;  $p = 0,0029$ ), siendo mayor en el segundo.
- Pacientes con HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis vs. pacientes con ATL (5,74% vs. 60,3%;  $p = 0,0036$ ), siendo mayor en el segundo.

Respecto al porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7, este presentó diferencia estadísticamente significativa al compararse medianas entre grupos según estado de infección (3,01% vs. 3,65% vs. 11,58% vs. 57,3%;  $p = 0,001$ ;  $X^2 = 16,3$ ) (**Tabla 3 y Gráfica 2B**). Las comparaciones relevantes incluyeron:

- Coinfectados vs. pacientes con HTLV-1 y antecedente (11,85% vs. 3,65%;  $p = 0,0052$ ), habiendo una mayor expresión en los primeros.

- Coinfectados vs. pacientes con HTLV-1 sin antecedente (11,85% vs. 3,01%;  $p = 0,0046$ ), haciendo una mayor expresión en los primeros.
- No hubo diferencia entre coinfectados y pacientes con ATL (11,85% vs. 57,3%;  $p = 0,0667$ ), habiendo una mayor expresión en los segundos.

No se observaron diferencias significativas entre HTLV-1 con y sin antecedente de estrongiloidiasis (3,65% vs. 3,01%;  $p = 0,413$ ), pero sí entre:

- Pacientes con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis vs. pacientes con ATL (3,65% vs. 57,3%;  $p = 0,0029$ ), siendo mayor en los segundos.
- Pacientes con HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis vs. pacientes con ATL (3,01% vs. 57,3%;  $p = 0,0021$ ), siendo mayor en los segundos.

### **Expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ según presentación clínica**

En la evaluación por presentación clínica (estrongiloidiasis activa, ATL, PET y asintomáticos), se observaron diferencias significativas en la expresión de CADM1 (22,15% vs. 60,3% vs. 10,07% vs. 5,74%;  $p = 0,001$ ,  $X^2 = 16,7$ ) (**Tabla 4 y Gráfica 2C**).

Al comparar el grupo de pacientes con estrongiloidiasis contra el de pacientes con ATL, no se encontró una diferencia significativa (22,15% vs. 60,3%;  $p = 0,1714$ ). De manera similar, ocurrió entre pacientes con estrongiloidiasis y pacientes con PET (22,15% vs. 10,07%;  $p = 0,181$ ). Por contraparte, se encontró una mayor expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes con estrongiloidiasis que en pacientes asintomáticos (22,15% vs. 5,74%;  $p = 0,0025$ ).

Por otro lado, al comparar la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ entre pacientes con ATL y pacientes con PET fue significativamente mayor en los primeros

(60,3% vs. 10,07%;  $p = 0,0196$ ). De similar manera, esta variable fue mayor en pacientes con ATL que en pacientes asintomáticos (60,3% vs. 5,74%;  $p = 0,0007$ ).

Por último, se encontró mayor expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes con PET que en pacientes asintomáticos (10,07% vs. 5,74%;  $p = 0,0446$ ).

### **Resultados de expresión de CADM1 y no expresión de CD7 en linfocitos T CD4+ según presentación clínica**

Respecto al porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7 según presentación clínica (estrongiloidiasis activa, ATL, PET y asintomáticos), este presentó diferencia estadísticamente significativa al compararse medianas entre grupos (11,85% vs. 57,3% vs. 4,62% vs. 2,7%;  $p = 0,0003$ ,  $X^2 = 18,49$ ) (**Tabla 4 y Gráfica 2D**).

Al comparar el grupo de pacientes con estrongiloidiasis contra el de pacientes con ATL, no se encontró una diferencia significativa (11,85% vs. 57,3%;  $p = 0,0667$ ), pero sí al comparar pacientes con estrongiloidiasis contra pacientes con PET, siendo mayor en los primeros (11,85% vs. 4,62%;  $p = 0,0496$ ). En esta misma línea, se encontró mayor expresión de CADM1 y no expresión de CD7 en linfocitos T CD4+ en pacientes con estrongiloidiasis que en asintomáticos (11,85% vs. 2,7%;  $p = 0,0006$ ).

Por otro lado, esta variable fue significativamente mayor en pacientes con ATL que en pacientes con PET (57,3% vs. 4,62%;  $p = 0,0112$ ). De similar manera, fue mayor en pacientes con ATL que en pacientes asintomáticos (57,3% vs. 2,7%;  $p = 0,0007$ ).

Por último, al comparar esta variable entre pacientes con PET y pacientes asintomáticos, se encontró que no había diferencia significativa (4,62% vs. 2,7%;  $p = 0,0582$ ).

### **Correlación entre carga proviral de HTLV-1 y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+**

Cuando evaluamos el coeficiente de correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y la carga proviral de HTLV-1 (copias/100 PBMCs) para seis eventos, encontramos un valor de 0,9; lo cual corresponde a una correlación muy alta (**Gráfica 3**).

### **Correlación entre carga proviral de HTLV-1 y carga parasitaria de SS**

Cuando evaluamos el coeficiente de correlación entre la carga proviral de HTLV-1 (copias/100 PBMCs) y la carga parasitaria de SS (larvas/gr) para cinco eventos, encontramos un valor de -0,4; lo cual corresponde a una ausencia de correlación (**Gráfica 3**).

### **Correlación entre carga parasitaria de SS y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+**

Cuando evaluamos el coeficiente de correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y la carga parasitaria de SS (larvas/gr) para cinco eventos, encontramos un valor de -0,4; lo cual corresponde a una ausencia de correlación (**Gráfica 3**).

## V. DISCUSIÓN

### Epidemiología

Si bien en los grupos analizados en nuestro estudio no se han observado diferencias estadísticamente significativas con respecto a las características epidemiológicas, la bibliografía reporta que sí las hay. A nivel mundial la prevalencia del HTLV-1 aumenta proporcionalmente a la edad con un predominio sobre el sexo femenino.<sup>18</sup> Siendo la transmisión sexual el factor más importante en su transmisibilidad, posiblemente por exposición acumulada.<sup>19</sup> Además, se reporta que la ocupación en que más predomina es la prostitución, ocupación no reportada en ningún participante de nuestro estudio. Con respecto al *SS*, se reporta que el sexo masculino se asocia más a la infección parasitaria;<sup>20</sup> mientras que en nuestro estudio, la mitad de las infecciones activas eran del sexo femenino y de ocupación, ama de casa. Siendo algo llamativo a lo reportado en personas procedentes de regiones endémicas como en el sudeste asiático.<sup>21</sup>

En los pacientes analizados, se observa un mayor porcentaje de pacientes naturales de la sierra y selva, pero que no alcanza un nivel estadísticamente significativo, probablemente por el tamaño muestral. Este dato va acorde a lo reportado en la literatura, que menciona que la región surandina y amazónica del Perú son áreas endémicas del virus.<sup>22</sup> En mención al parásito, se conoce que las regiones endémicas en nuestro país son las tropicales y subtropicales, y que la posibilidad de autoinfección del *SS* le capacita permanecer en el hospedero incluso hasta décadas.<sup>23,24</sup> Esto es importante en regiones urbanas de la costa peruana debido a la presencia de inmigrantes naturales de zonas endémicas, como es el caso de la mayoría de pacientes de nuestro estudio.

Por otro lado, hasta un 63.8% de los pacientes analizados cuentan por lo menos con un familiar de primer grado con HTLV-1, respaldando el dato de que el tener un progenitor infectado es un factor de riesgo.<sup>25</sup> Esto podría deberse al limitado acceso a la salud que tiene esta región para realizar tamizajes en zonas endémicas y despistaje prenatal en hijos de madres con serología positiva, como también a la falta de conocimiento sobre la contraindicación de lactancia materna en madres con HTLV-1.

### **Expresión de PD-1 y PD-L1 en linfocitos T CD4+**

Según los resultados obtenidos, la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ no es significativamente diferente entre los grupos comparados, incluyendo entre pacientes con coinfección activa y aquellos únicamente infectados por HTLV-1 y sin antecedente de estrongiloidiasis. De ello, se deduce que, al menos mediante el análisis de linfocitos T de sangre periférica, no es posible postular que estos puntos de control inmunológicos estén involucrados en la progresión acelerada hacia ATL en pacientes coinfectados. Sin embargo, dicho mecanismo no se descarta como una posible explicación a lo expuesto, ya que se requerirían estudios que analicen la expresión de estas moléculas en linfocitos T CD4+ en muestras de biopsias de ganglios linfáticos mediante inmunohistoquímica, de manera análoga a los trabajos de Miyoshi et al. (2016)<sup>13</sup> y Takeuchi et al. (2020).<sup>14</sup> Los mismo resultados, fueron observados para la expresión de PD-L1 en linfocitos T CD4+ CADM1+/CD7- por lo que se concluye también que estas células, con progresión hacia la malignidad, en sangre periférica no se verían involucradas en dicho mecanismo fisiopatológico. Ante estos hallazgos, también consideramos que se deberían explorar otros mecanismos inmunomoduladores como citoquinas y otros puntos de control inmunológicos como CTLA-4.

### **Expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+**

Respecto a la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+, al compararla según el estado infeccioso de los pacientes, se obtuvo que esta es significativamente mayor en los pacientes coinfectados que en pacientes con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis y también en pacientes con HTLV-1 sin antecedente de estrongiloidiasis, sin haber diferencia entre estos últimos dos grupos. Estos hallazgos sugieren que el efecto inmunomodulador ejercido por el nemátodo solo se vería presente durante la coinfección activa. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que no se encontró diferencia significativa para la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ entre los pacientes con HTLV-1 con antecedente de estrongiloidiasis y aquellos sin este antecedente.

Por otro lado, al comparar esta misma variable entre pacientes con ATL y el resto de grupos, se obtuvo que la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ es mayor que en los dos grupos de pacientes con HTLV-1 y sin infección actual por SS, lo cual es congruente con la información descrita en la literatura, ya que la proliferación neoplásica de linfocitos T lleva a una mayor expresión de células CADM1+. No obstante, al comparar esta variable entre pacientes con ATL y pacientes coinfectados, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa. Este hallazgo fuera de lo esperado podría explicarse por la baja cantidad de individuos dentro del grupo ATL.

Al analizar la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ según la presentación clínica de los pacientes, se encontró que esta era mayor en pacientes con estrongiloidiasis que en asintomáticos, lo cual también es congruente con el mecanismo planteado de que SS lleva a una mayor progresión de la infección por HTLV-1 al ejercer una supresión de la respuesta T<sub>H1</sub> mediante activación de la respuesta T<sub>H2</sub>. Asimismo, también se encontró una mayor expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes con PET

que en pacientes asintomáticos, lo cual se podría explicar por el mismo estado de autoinmunidad que implica esta primera condición. La activación de la respuesta inmune en PET llevaría a una mayor proliferación de linfocitos T CD4+ como parte de la respuesta adaptativa a los autoantígenos, lo cual se reflejaría también en una mayor proliferación de los linfocitos T CD4+ infectados por HTLV-1; es decir, aquellos que expresan CADM1.

No se hallaron diferencias entre pacientes con estrongiloidiasis y pacientes con PET, pudiendo deberse a que ambas condiciones llevan a una mayor proliferación de linfocitos T, incluyendo a aquellos infectados por el retrovirus.

#### **Expresión de CADM1 y no expresión de CD7 en linfocitos CD4+**

Según los estudios citados previamente, los linfocitos T CD4+ CADM1+ CD7- en pacientes con HTLV-1 reflejan las células infectadas que se encuentran progresando a ATL. Dicho esto, los hallazgos de nuestro estudio esclarecen resultados similares entre los grupos que los encontramos para la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+. De la misma manera, se encontró mayor cantidad de estas células en pacientes con coinfección que en pacientes infectados solamente con HTLV-1 con o sin antecedente de SS. Asimismo, también se encontró que no había diferencia para esta variable entre estos dos últimos grupos. Estos dos hallazgos también refuerzan la idea de que el efecto modulador ejercido por SS sobre la respuesta antitumoral solo se presentaría durante la coinfección activa, mas no habría un efecto residual en aquellos pacientes con antecedente de estrongiloidiasis. Por lo tanto, tener solo el antecedente de dicha parasitosis no implicaría un riesgo de presentar una progresión acelerada hacia la ATL. De igual manera, consideramos que se requerirían estudios de cohorte o casos y controles para determinar si se trata o no de un factor de riesgo.

Asimismo, se obtuvieron resultados que demostraban que el porcentaje de linfocitos T CD4+ CADM1+ CD7- era mayor en los individuos con ATL en comparación con cualquiera de los otros 3 grupos, habiendo una menor diferencia con los pacientes coinfectados. Estos hallazgos son compatibles con lo encontrado por los estudios anteriormente citados, ya que las mismas células neoplásicas se caracterizan por este fenotipo.

Al analizar esta misma variable y compararla entre los pacientes según su presentación clínica, se encontró que era mayor en pacientes con estrongiloidiasis que en pacientes con PET. Asimismo, esta misma variable no presentó diferencias en pacientes con PET y asintomáticos. Estos dos hallazgos en conjunto sugieren que los pacientes con estrongiloidiasis, a diferencia de los pacientes con PET, presentan mayor cantidad de células similares a ATL, por lo que tendría mayor riesgo de progresión hacia dicha neoplasia. Si bien los pacientes con PET, podrían presentar mayor proliferación de linfocitos T infectados por HTLV-1 (CADM1+) que los pacientes asintomáticos, no presentan mayor proliferación de linfocitos similares a ATL (CADM1+ CD7-), por lo que no se podría plantear como una condición que aumente el riesgo de progresión a ATL, a diferencia de la estrongiloidiasis en pacientes con HTLV-1.

Es relevante recalcar también que los pacientes con estrongiloidiasis presentaron mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ CADM1+ CD7- que los pacientes asintomáticos, lo cual también se encuentra en sintonía con lo descrito en los estudios citados. Esto justamente refleja la capacidad de dicho helminto en acelerar el curso natural de la infección por HTLV-1 hacia ATL.

**Correlaciones entre carga proviral de HTLV-1, carga parasitaria de SS y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+**

Al analizar la correlación entre la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ y la carga proviral de HTLV-1 en pacientes coinfectados, se evidenció una correlación muy alta, lo cual es lógico y contribuye a considerar a la molécula CADM1 como un marcador fidedigno para estimar la progresión de la infección por HTLV-1. En este sentido, CADM1 podría ser usado como indicador indirecto de progresión de la enfermedad, como un método alternativo a la carga proviral. Se requerirían más estudios con mayor cantidad de individuos para poder establecerlo con mayor certeza.

Por lo contrario, no se encontró ninguna correlación entre la carga parasitaria y alguna de las otras dos variables mencionadas. Si bien se entiende que una mayor carga parasitaria se correlacione con una mayor carga proviral y, por consiguiente, con una mayor expresión de CADM1, por mayor riesgo de hiperinfección con *SS* en la coinfección, este no fue nuestro hallazgo. Probablemente, se requieran más individuos coinfectados para lograr una mejor aproximación, así como individuos en condición de hiperinfección por *SS*. Sin embargo, también podría explicarse la ausencia de correlación debido a la variabilidad de la carga parasitaria medida por el método de Baermann en diferentes muestras de un mismo paciente.

### **Limitaciones y fortalezas**

Este estudio presenta limitaciones a considerar al interpretar los resultados. En primer lugar, la selección de los participantes fue por conveniencia, buscando contar con un número equilibrado de individuos en cada grupo por el disminuido tamaño muestral. Esto pudo haber generado cierto sesgo de selección y limitar la posibilidad de generalizar los hallazgos a otras poblaciones. Además, el tamaño muestral reducido, propio de un estudio piloto, disminuye la capacidad para detectar diferencias pequeñas en la expresión de los marcadores inmunológicos analizados.

Por otro lado, los antecedentes de infección por *SS* se basaron en lo referido verbalmente por algunos participantes, ya que no se contaba con evidencia física de infección parasitológica previa. En adición, en los pacientes con infección activa de *SS*, se desconoce el tiempo de exposición al parásito. Esto podría haber llevado a una clasificación inexacta del estado real de coinfección, afectando parcialmente la comparación entre grupos.

Asimismo, el uso de muestras criopreservadas, aunque es una práctica habitual en este tipo de investigaciones, podría haber afectado en cierta medida la viabilidad celular o la intensidad de fluorescencia obtenida por citometría de flujo.

Por otro lado, este estudio solamente consideró al eje PD-1/PD-L1 como puntos de control inmunológico, dejando de lado a otros como CTLA-4, IAG-3, OX40, ICOS, TIGIT y CD40.

Adicionalmente, al tratarse de un estudio observacional, no fue posible controlar completamente factores que podrían influir en los resultados, como tratamientos antiparasitarios previos, estado nutricional, carga viral o presencia de otras infecciones. En esta línea, al ser un estudio transversal, no se evaluó la evolución cuantitativa de los marcadores en cada paciente coinfectado tras el tratamiento con ivermectina. Esto sería ideal para establecer una mejor asociación entre la resolución de la parasitosis y la normalización del perfil de CADM1 y CD7. Finalmente, la cohorte procede de un solo centro, lo que limita la representatividad geográfica y clínica, y restringe la extrapolación de los hallazgos a otras poblaciones y a la realidad.

A pesar de estas limitaciones, este trabajo constituye un primer acercamiento exploratorio que aporta información valiosa sobre la interacción entre HTLV-1 y *SS*. Sus resultados permiten identificar aspectos que deberán ser considerados en futuros

estudios con un diseño prospectivo, mayor tamaño muestral y un control más riguroso de las variables involucradas.

## VI. CONCLUSIONES

En conclusión, no existe diferencia significativa en la expresión de PD-1 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, ni en la expresión de PD-L1 en linfocitos T CD4+ CADM1+/CD7- en sangre periférica entre los grupos evaluados. Ello sugiere que el mecanismo por el cual los pacientes coinfectados presentan una progresión más rápida hacia la ATL que los pacientes únicamente infectados por HTLV-1, no ocurre mediante el eje PD-1/PD-L1. Sin embargo, consideramos que sería necesario realizar la misma comparación con muestras celulares de biopsias de ganglios linfáticos. Se recomienda explorar otros posibles mecanismos inmunológicos, así como validar CADM1 como marcador pronóstico en estudios longitudinales y multicéntricos.

Además, los resultados muestran que la expresión de CADM1 y el fenotipo CADM1+/CD7- presenta valores similares entre individuos con HTLV-1 con antecedente de strongiloidiasis y sus pares sin dicho antecedente. A su vez, estos dos grupos presentaron valores inferiores a los pacientes coinfectados, por lo que concluimos que el efecto inmunomodulador presente en la coinfección activa es indistinto a la presencia o ausencia del antecedente de strongiloidiasis en pacientes únicamente infectados por HTLV-1, pudiendo descartar la posibilidad de un efecto inmunomodulador residual por parte del parásito. Finalmente, encontramos una correlación directamente proporcional y significativa entre la carga proviral de HTLV-1 y la expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+, lo cual ratifica que dicho marcador celular sería fidedigno para estimar la cantidad de linfocitos T CD4+ infectados por dicho virus. Esto posiciona a CADM1 como una herramienta útil para el pronóstico y seguimiento de la progresión de la enfermedad.

## I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(4):266-281. doi:10.1016/S1473-3099(07)70081-6
2. Akbarin MM, Rahimi H, Hassannia T, Shoja Razavi G, Sabet F, Shirdel A. Comparison of HTLV-I Proviral Load in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma (ATL), HTLV-I-Associated Myelopathy (HAM-TSP) and Healthy Carriers. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(3):208-212.
3. Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol.* 2007;60(12):1373-1377. doi:10.1136/jcp.2007.052456
4. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005;105(3):1204-1213. doi:10.1182/blood-2004-03-1222
5. Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, et al. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia.* 2012;26(6):1238-1246. doi:10.1038/leu.2011.379
6. Makiyama J, Kobayashi S, Watanabe E, et al. CD4+CADM1+ cell percentage predicts disease progression in HTLV-1 carriers and indolent adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 2019;110(12):3746-3753. doi:10.1111/cas.14219
7. Bangham CRM, Ratner L. How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL) and HAM/TSP? *Curr Opin Virol.* 2015;14:93–100.
8. Montanheiro P, Smid J, de Oliveira ACP, da Silva MTT, Casseb J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): interplay between viral infection and host immune response in the development of HAM/TSP. *Viruses.* 2021;13(11):2163
9. Montes M, Sawhney C, Barros N. Strongyloides stercoralis: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(5):500-504. doi:10.1097/QCO.0b013e32833df718
10. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to Strongyloides stercoralis antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(6):e456. Published 2009 Jun 9. doi:10.1371/journal.pntd.0000456
11. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7:550. Published 2016 Dec 12. doi:10.3389/fimmu.2016.00550
12. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, et al. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer.* 2007;121(12):2585-2590. doi:10.1002/ijc.23042
13. Miyoshi H, Kiyasu J, Kato T, et al. PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2016;128(10):1374-1381. doi:10.1182/blood-2016-02-698936
14. Takeuchi M, Miyoshi H, Nakashima K, et al. Comprehensive immunohistochemical analysis of immune checkpoint molecules in adult T cell leukemia/lymphoma. *Ann Hematol.* 2020;99(5):1093-1098. doi:10.1007/s00277-020-03967-x

15. Rauch DA, Conlon KC, Janakiram M, et al. Rapid progression of adult T-cell leukemia/lymphoma as tumor-infiltrating Tregs after PD-1 blockade. *Blood*. 2019;134(17):1406-1414. doi:10.1182/blood.2019002038
16. Ishitsuka K, Utsunomiya A, Ishida T. PD-1 Inhibitor Therapy in Adult T-Cell Leukemia–Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;379(7):695. doi:10.1056/NEJMc1807852
17. Rajamanickam A, Munisankar S, Dolla C, Nutman TB, Babu S. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4)- and Programmed Death 1 (PD-1)-Mediated Regulation of Monofunctional and Dual Functional CD4+ and CD8+ T-Cell Responses in a Chronic Helminth Infection. *Infect Immun*. 2019;87(12):e00469-19. Published 2019 Nov 18. doi:10.1128/IAI.00469-19
18. Martel M, Gotuzzo E. HTLV-1 Is Also a Sexually Transmitted Infection. *Front Public Health*. 2022 Mar 31;10:840295. doi: 10.3389/fpubh.2022.840295. PMID: 35433594; PMCID: PMC9008201.
19. Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL, Hermansen S, Roberts C, Lal R, et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: Association with viral load. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1996;12(2):193–201.
20. Arakaki T, Kohakura M, Asato R, Ikeshiro T, Nakamura S, Iwanaga M. Epidemiological aspects of *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. *J Trop Med Hyg*. 1992 Jun;95(3):210-3. PMID: 1597879.
21. al-Madani AA, Mahfouz AA. Prevalence of intestinal parasitic infections among Asian female house keepers in Abha District, Saudi Arabia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1995 Mar;26(1):135-7. PMID: 8525400.
22. 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. doi:10.1016/j.ijid.2013.10.005
23. Junior KN, Zaman R, Zaman MH, Zaman T, 2017. Twenty-five years of chronic strongyloidiasis in an immigrant. *Clin Med Insights Case Rep* 10: 1179547616684828. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
24. Loscalzo J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21st ed. New York: McGraw-Hill Education; 2022. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com>
25. Sanchez-Palacios C, Gotuzzo E, Vandamme AM, Maldonado Y. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. *Int J Infect Dis*. 2003 Jun;7(2):132-7. doi: 10.1016/s1201-9712(03)90009-9. PMID: 12839715.

## IX. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

**Tabla 1:** características epidemiológicas y patológicas de los participantes.

CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES Y ESTADO DE INFECCIÓN					
Características	Estado de infección			Valor de P	Total N= 36
	HTLV-1+ con SS N= 6	HTLV-1+ con SS previo N= 12	HTLV-1+ sin SS previo N= 18		
<b>Pacientes</b>					
Mediana de edad (IQR) - años	45 (35–47)	52.5 (39–61.5)	49 (32–55)	0.508†	47 (35.5–58)
Sexo femenino - no (%)	3 (50%)	9 (75%)	15 (83.3%)	0.132‡	27 (75%)
Ocupación - Ama de casa (%)	3 (50%)	4 (33.3%)	8 (44.4%)	0.773‡	15 (41.7%)
<b>Lugar de nacimiento - no (%)</b>				0.563‡	
Costa	1 (16.7%)	6 (50%)	6 (33.3%)		13 (36.1%)
Sierra	3 (50%)	4 (33.3%)	10 (55.5%)		17 (47.2%)
Selva	2 (33.3%)	2 (16.7%)	2 (11.1%)		6 (16.7%)
<b>Lugar de procedencia - no (%)</b>				0.071‡	
Costa	4 (66.6%)	12 (100%)	14 (77.7%)		30 (83.3%)
Sierra	2 (33.3%)	-	3 (16.7%)		5 (13.8%)
Selva	-	-	1 (5.5%)		1 (2.7%)
<b>Condición metabólica coexistente - no (%)</b>	4 (66.6%)	3 (25%)	7 (38.8%)	0.227‡	14 (38.9%)
<b>Condición autoinmune coexistente - no (%)</b>	2 (33.3%)	1 (8.3%)	3 (16.7%)	0.477‡	6 (16.7%)
<b>Antecedente infeccioso no SS/HTLV-1 - no (%)</b>	2 (33.3%)	4 (33.3%)	1 (5.5%)	0.132‡	7 (19.4%)
<b>Familiares afectados por HTLV-1 - no (%)</b>				0.265*	
0 familiar afectado	3 (50%)	3 (25%)	7 (38.9%)		13 (36.1%)
1 familiar afectado	2 (33.3%)	4 (33.3%)	8 (44.4%)		14 (38.8%)
2 o más familiares afectados	1 (16.7%)	5 (41.7%)	3 (16.7%)		9 (25%)
<b>Familiares afectados por SS - no (%)</b>				0.140‡	
0 familiar afectado	4 (66.6%)	11 (91.6%)	16 (88.8%)		31 (86.1%)
1 familiar afectado	1 (16.7%)	1 (8.3%)	2 (11.1%)		4 (11.1%)
2 o más familiares afectados	1 (16.7%)	-	-		1 (2.7%)
<b>Clínica presente - no (%)</b>				0.327‡	
HTLV-1 sin PET ni ATL	4 (66.6%)	9 (75%)	8 (44.4%)		21 (58.3%)
PET	2 (33.3%)	2 (16.7%)	7 (38.9%)		11 (30.5%)
ATL	-	1 (8.3%)	3 (16.7%)		4 (11.1%)

† Prueba de Kruskal-Wallis (distribución no normal)

\*Prueba de Chi-cuadrado

‡ Prueba exacta de Fisher (frecuencias esperadas <5)

**Tabla 2:** Porcentajes de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan PD-1, y de linfocitos T CD4+ CADM1+ CD7- que expresan PD-L1 según estado de infección.

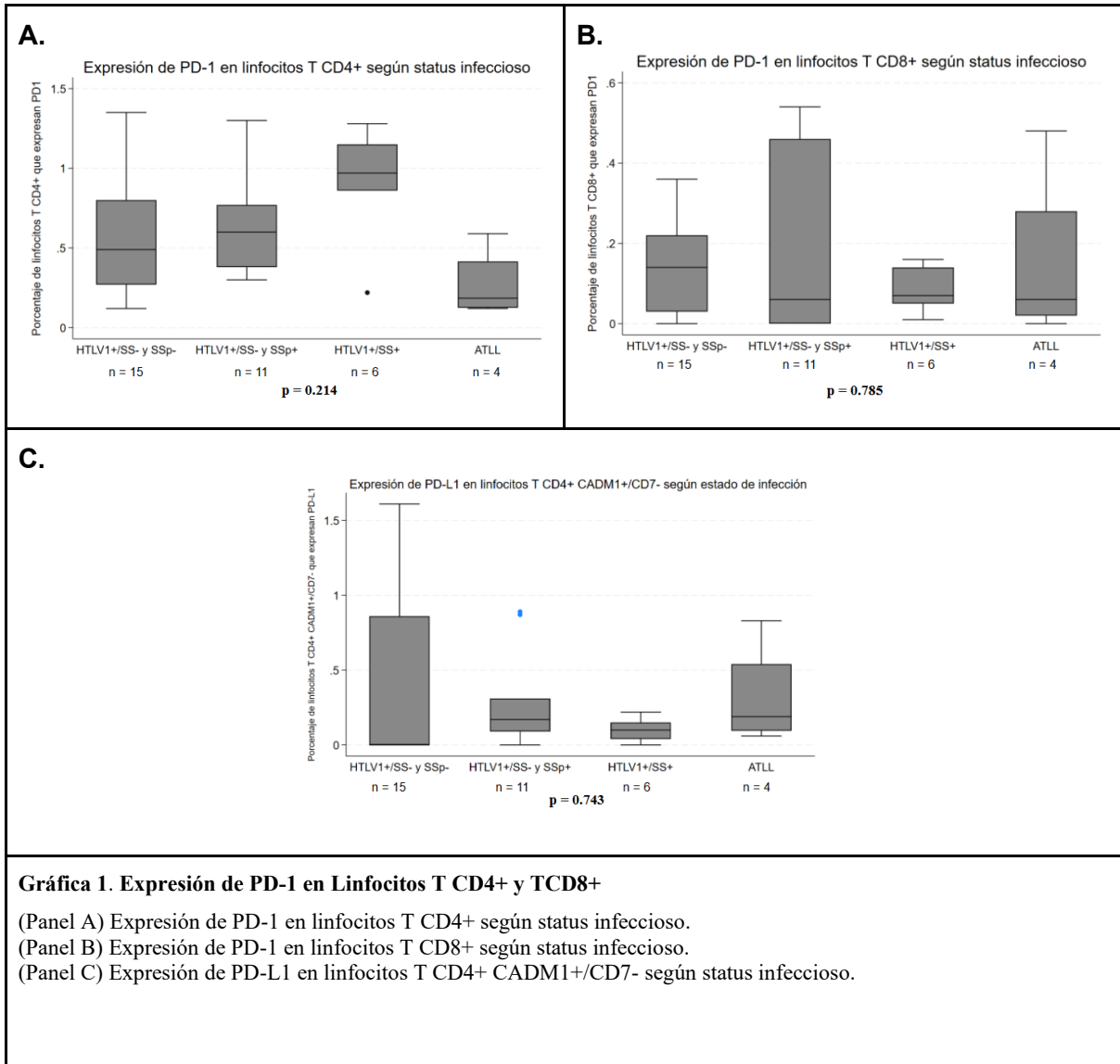
	PD1 en LTCD4+	PD1 en LTCD8+	PD-L1 en LTCD4+ CADM1+/CD7-
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
HTLV-1/SS- γ pSS-	0,49 (0,29-0,74)	0,14 (0,05-0,21)	0 (0,0-0,71)
HTLV-1/SS- γ pSS+	0,6 (0,44-0,74)	0,06 (0,00-0,45)	0,17 (0,1-0,29)
HTLV-1+/SS+	0,97 (0,89-1,11)	0,07 (0,05-0,13)	0,1 (0,05-0,14)
ATL	0,61 (0,55-0,65)	0,06 (0,03-0,18)	0,19 (0,11-0,4)

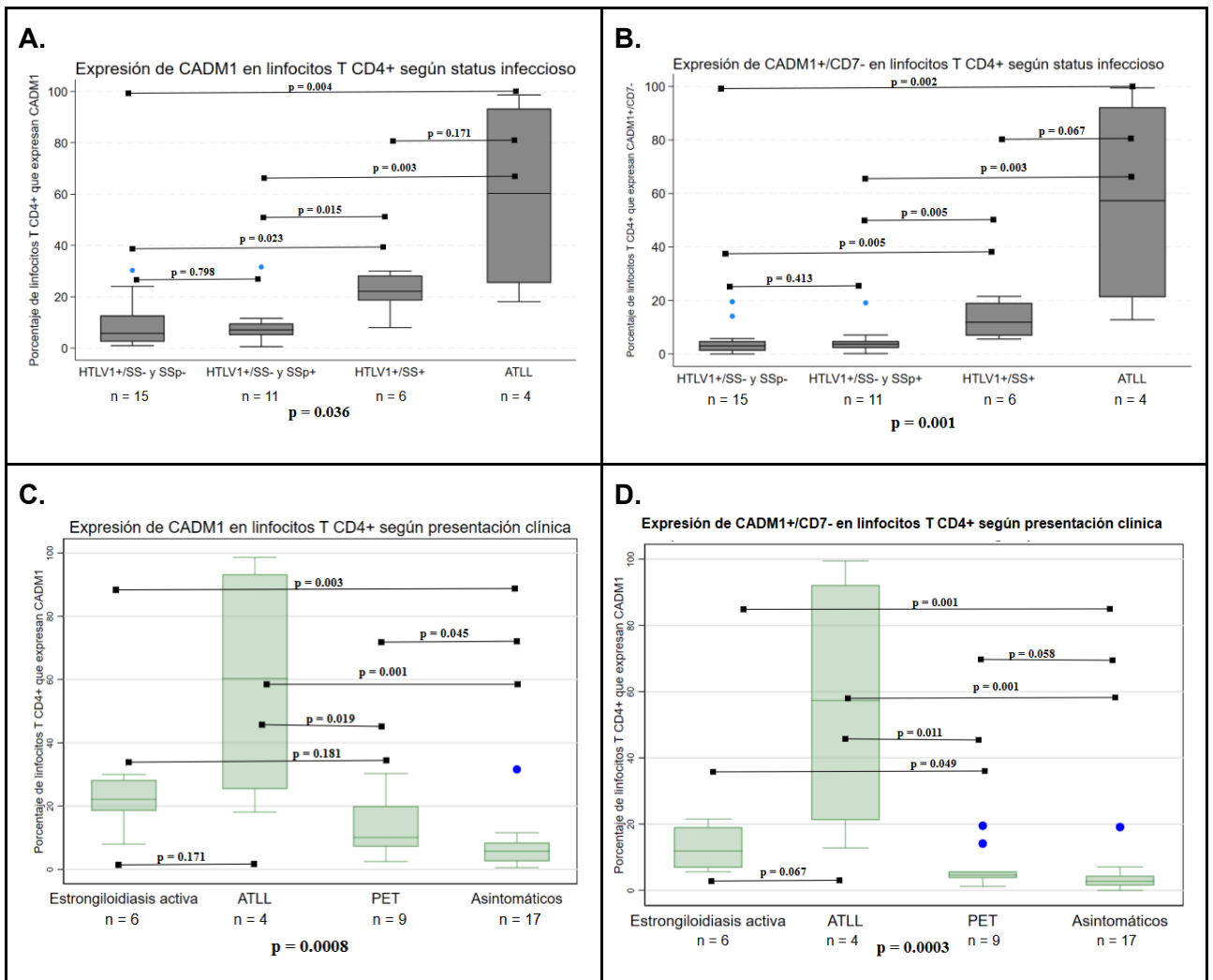
**Tabla 3:** Porcentajes de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7 según estado de infección.

	CADM1 en LTCD4+	CADM1 y ausencia de CD7 en LTCD4+
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
HTLV-1/SS- γ pSS-	5,74 (2,5-11,4)	3,01 (1,21-4,82)
HTLV-1/SS- γ pSS+	7,11 (5,46-9,04)	3,65 (2,2-4,88)
HTLV-1+/SS+	22,15 (19,05-27,13)	11,85 (6,8-19,1)
ATL	60,3 (28,98-90,66)	57,3 (21,19-92,24)

**Tabla 4:** Porcentajes de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7 según presentación clínica.

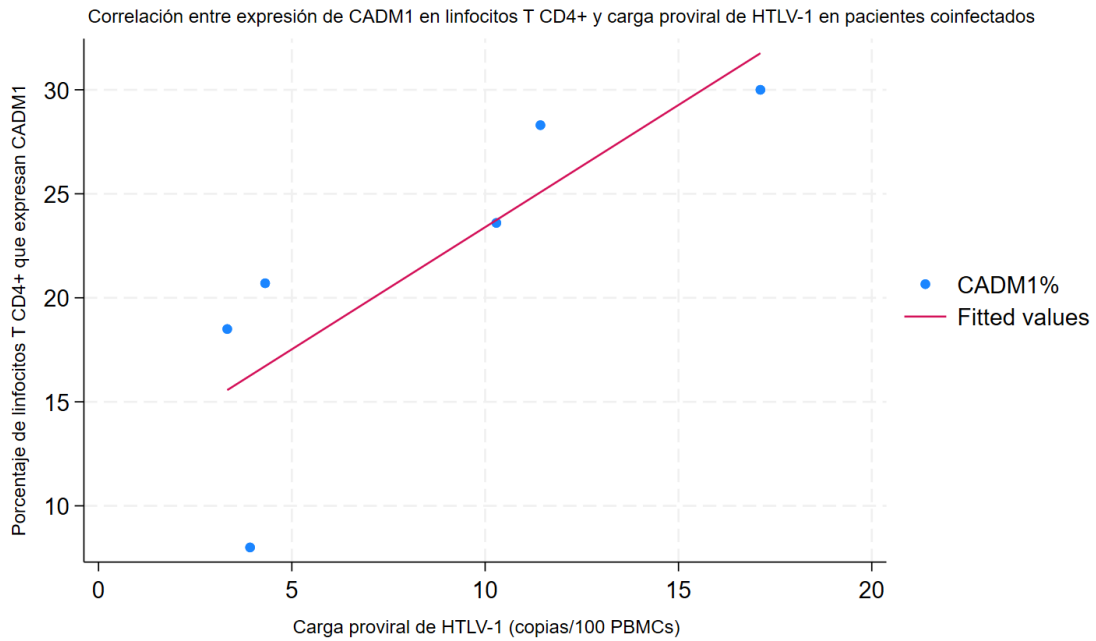
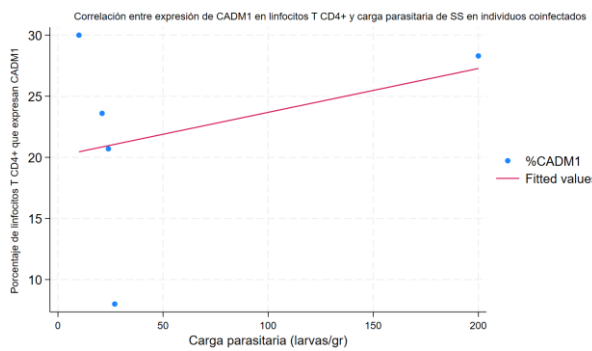
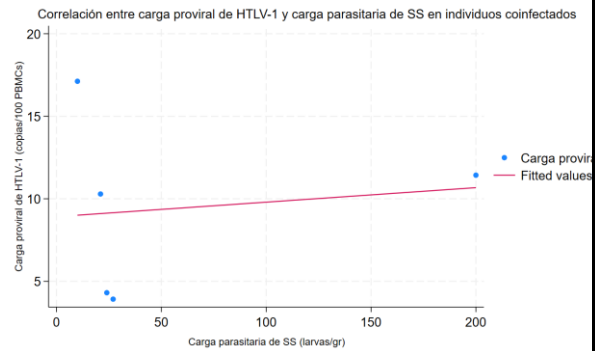
	CADM1 en LTCD4+	CADM1 y ausencia de CD7 en LTCD4+
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)
SS activa	22,15 (19,05-27,13)	11,85 (7,78-17,58)
ATL	60,3 (28,98-90,66)	57,3 (25,4-88,62)
PET	10,07 (7,11-20,04)	4,62 (3,65-5,74)
Asintomático	5,74 (2,52-8,5)	2,7 (1,41-4,45)





**Gráfica 2. Expresión de CADM1 y CD7 en Linfocitos T CD4+**

(Panel A) Expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ según status infeccioso.  
 (Panel B) Expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4+ según status infeccioso.  
 (Panel C) Expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ según presentación clínica.  
 (Panel D) Expresión de CADM1 y CD7 en linfocitos T CD4+ según presentación clínica.

**A.****B.****C.**

**Gráfica 3. Correlaciones entre carga proviral de HTLV-1, carga parasitaria de SS y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes coinfectados.**

(Panel A) Correlación entre carga proviral de HTLV-1 y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes coinfectados.

(Panel B) Correlación entre carga parasitaria de SS y expresión de CADM1 en linfocitos T CD4+ en pacientes coinfectados.

(Panel C) Correlación entre carga proviral de HTLV-1 y carga parasitaria de SS.

## ANEXOS

### Anexo 1: Definición operacional de variables

Variable	Tipo	Escala de medición	Definición operacional	Dimensiones/Categorías	Fuente de datos
Expresión relativa de PD-1/PD-L1 en linfocitos T	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ que expresan PD-1, y porcentaje de linfocitos T CD4+ CADM1+/CD7- que expresan PD-L1.	-	Citometría de flujo
Expresión relativa de CADM1 y CD7 en linfocitos T	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y CD7.	-	Citometría de flujo
Carga proviral en sangre periférica	Cuantitativa	Continua	Medido por copias/100 PBMCs	-	PBMCs corridos por RT-qPCR en historias clínicas
Concentración de larvas en heces	Cuantitativa	Continua	Medido por larvas/gr	-	Diagnóstico por test de Baermann modificado en historias clínicas
Estado de infección	Cualitativa	Nominal	Patógenos presentes en el individuo	Infectados con HTLV-1 con infección previa de SS Infectados con HTLV-1 sin infección previa de SS Coinfectados con HTLV-1 y SS Pacientes con ATL	Revisión de las historias clínicas con diagnóstico por prueba de Baermann modificada o agar placa positivo para SS, y serología y Western Blot positivas para HTLV-1.

Presentación clínica	Cualitativa	Nominal	Enfermedad asociada a HTLV-1 presentada en el individuo.	ATL	Revisión de las historias clínicas.
				PET	
				Estrongiloidiasis activa	
				Asintomáticos	

## Anexo 2:

### I. Protocolo de descriopreservación de PBMCs

- Calentar agua en Beaker de 200 ml a 40°C
- Tener un rack azul con tapa
- Llevar el Beaker con el termómetro y el rack al criobanco
- Sacar el criovial
- En paralelo poner el agua caliente en el rack hasta la línea azul inferior
- Pasar inmediatamente el criovial al rack, con cuidado de choque térmico.
- Inmediatamente ir a la campana donde ya se tiene:
  - Tubo de centrifuga de 15 ml
  - Pipeta serológica de 5 y 10 ml
  - Pipetero
  - RPMI incompleto
  - 1 par de guantes
- Previamente tener 10 ml de RPMI en el tubo de centrifuga de 15
- Con la pipeta de 5 ml sacar el contenido del criovial y ponerlo en el tubo de centrifuga.
- Si sigue congelado agregar un poco de RPMI del tubo de centrifuga al criovial y mezclar.
- Repetir hasta que se descongele todo.
- Tener lista la centrifuga a 500 g x 15 min Brake 0
- Centrifugar inmediatamente y luego decantar el sobrenadante

### II. Protocolo de tinción de PBMCs con anticuerpos

- En cada tubo de citometría, transferir 10 ul de los anticuerpos seleccionados y añadir 50 ul de la solución de PBMCs.
- Incubar por 30 minutos a 2 - 8 °C sin exposición a la luz
- Añadir 2 ml de PBS en cada tubo
- Centrifugar a 300 x g por 5 minutos y luego remover el sobrenadante
- Lavar las células con 500 ul de PBS en cada tubo
- Correr las muestras en el citómetro de flujo

### III. Protocolo de citometría de flujo

- Se muestran las especificaciones técnicas del panel de fluorocromos a utilizar y los paneles de detección de fluorocromos según cada uno de los tres láseres

correspondientes al citómetro de flujo de modelo BD FACSCanto™ II. Estos paneles fueron obtenidos de la página web de BD Biosciences.

Lasers	Fluorescence channel	Fluorochromes	Filters
405a violet	Blue (450/50)	BD Horizon™ V450 DAPI BD Horizon V500-C Alexa Fluor® 488	BD Horizon™ V450 Pacific blue AmCyan
	Green (510/50)	BD Horizon V500	
488 blue	Green (530/30)	FITC	488/10
	Yellow (585/42)	PE	530/30
	Red (670)	7-AAD PE-Cy5	585/42 NA 610 LP 655 LP
633 red	Infrared (780/60)	PE-Cy7	780/60
	Red (660/20)	APC Alexa Fluor® 647	670 LP 670 LP 735 LP
	Infrared (780/60)	BD APC-H7 APC-Cy7	780/60 780/60

Figuras 1 y 2: Especificaciones técnicas del citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

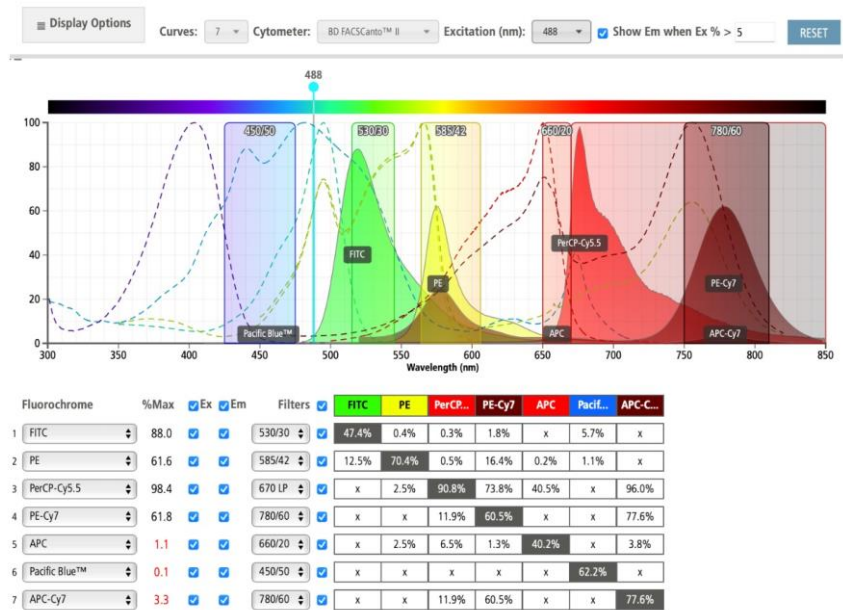


Figura 3: Panel de detección de fluorocromos para láser azul (488 nm) del citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

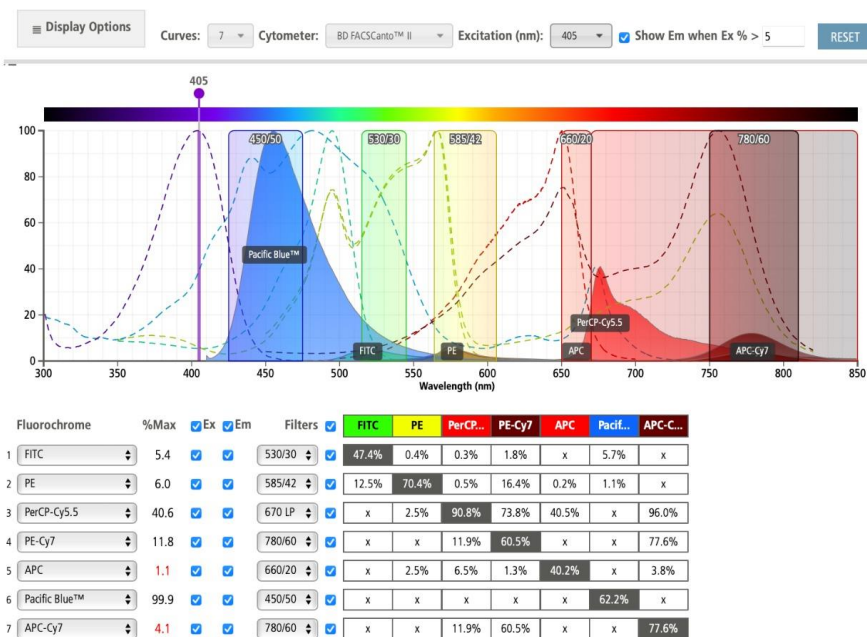


Figura 4: Panel de detección de fluorocromos para láser violeta (405 nm) del citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

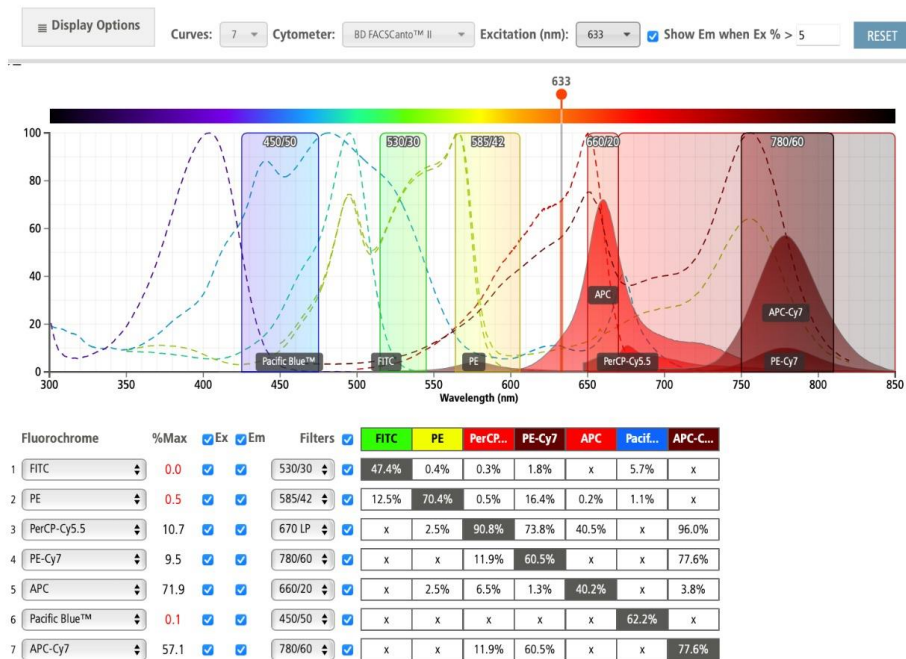


Figura 5: Panel de detección de fluorocromos para láser rojo (633 nm) del citómetro de flujo BD FACSCanto™ II

#### IV. Protocolo de RT-qPCR para detección de carga proviral

- Descongelamiento de los PBMCs según protocolo.
- Preparación del lisado celular a partir de células en suspensión (PBMCs)
  1. Adición de 200 uL del Buffer A de digestión al Pellet celular.
  2. Vortexear suavemente para mezclar.
- Tratamiento con ARNasa A para un ADN genómico libre de ARN:
  1. Adición de 10 KUnitz de ARNasa A a la suspensión celular (no sobrepasar los 20 uL).
  2. Mezclar bien
  3. Adición de 12 uL de Proteinasa K a la suspensión.
  4. Vortexear suavemente para mezclar.
  5. Incubar por 1 hora a 55°C.
    - a. El lisado se considera completado cuando se obtiene un lisado relativamente claro.
  6. Añadir 200 uL de Buffer SK al lisado. Vortexear para mezclar.
  7. Añadir 200 uL de etanol al 96 - 100%. Vortexear para mezclar.
- Unir a la Columna
  1. Armar una columna de centrifugación con un tubo de extracción.
  2. Llenar hasta 600 uL de la mezcla a la columna de centrifugación alistada.
  3. Tapar la columna y centrifugar la unidad por 3 minutos a 5 200 g (~ 8 000 RPM).
    - a. Asegurar, mediante inspección, que todo el volumen del lisado haya pasado al tubo de extracción.
    - b. Si no ha pasado todo el filtrado, centrifugar por 2 minutos a 14 000 g (~ 14 000 RPM).

4. Luego de la centrifugación, descarte el fluido y vuelva a montar la columna de centrifugación con su tubo de extracción.
  5. Repetir hasta que la mezcla de lisado haya pasado mediante la columna.
- Lavar ADN unido
    1. Añadir 500 uL de Solución de Lavado A a la columna y centrifugar por 1 minuto a 14 000 g (~ 14 000 RPM).
    2. Luego de la centrifugación, descarte el fluido y vuelva a montar la columna de centrifugación con su tubo de extracción.
    3. Añadir 500 uL de Solución de Lavado A a la columna y centrifugar por 2 minutos a 14 000 g (~ 14 000 RPM).
    4. Cuidadosamente libere la columna de centrifugación del tubo de extracción y descarte el tubo de extracción y el fluido.
      - a. En caso haya quedado líquido en la columna de centrifugación, descarte el líquido y rearme la columna de centrifugación con su tubo de extracción. Se recomienda volver a centrifugar por 1 minuto a 14 000 g (~ 14 000 RPM) para secar la columna.
  - Elución de ADN limpio
    1. Armar una columna de centrifugación (con ADN unido a la resina) con un tubo de Elución de 1.7 mL
    2. Añadir 200 uL del Buffer de Elución B al centro de la cama de resina. Centrifugar por 1 minuto a 3 000 g (~ 6 000 RPM). Parte del Buffer de Elución B pasará a través de la columna, esto permite que se dé la hidratación del ADN.
    3. Centrifuge por 2 minutos a 14 000 g (~ 14 000 RPM) para recolectar el volumen de elución total
    4. Realizar elución adicional si así desea. El rendimiento puede mejorar en un 20-30% si se realiza una segunda elución
  - El ADN genómico purificado puede guardarse entre 2-8°C por algunos días. Para almacenar por más tiempo se recomienda una temperatura de -20°C.

### Anexo 3: Presupuesto

<b>Producto</b>	<b>Unidades</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Precio</b>
Pacific Blue - anti-human CD3 100 tests	1	BioLegend	248.00 USD
FITC - anti-CADM1 100 tests	1	MBL	410.42 USD
PE - anti-human CD274 100 tests	1	BioLegend	264.00 USD
PerCP-Cy5.5 - anti-human CD279 100 tests	1	BioLegend	358.00 USD
PE-Cy7 - anti-human CD7 100 tests	1	BioLegend	248.00 USD
APC - anti-human CD4 100 tests	1	BioLegend	72.00 USD
APC-Cy7 anti-human CD8 100 tests	1	BioLegend	286.00 USD
<b>Total</b>	-	-	<b>1,886.42 USD</b>