

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EPIDEMIOLOGIA DEL HTLV EN LA AMAZONIA BRASILEÑA:
SEROPREVALENCIA E IDENTIFICACION DEL VIRUS
CIRCULANTE

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

LUIS ISAMU BARROS KANZAKI

MONTERREY, N. L.

ENERO, 1995

1
B3
1995
FCB
Z5320
TD

EPIDEMIOLOGIA DEL FETTY
ATTIVA BRASILEIRA:
SEROPREVALENCIA E IDENTIFICACION DEL VIRUS CIRCUCLANTE

L. B. K.
I. B. K.

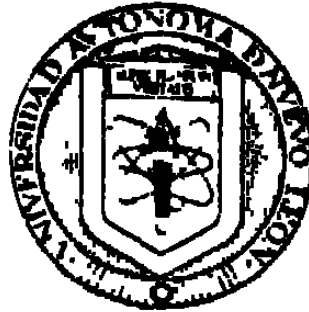
0099 - 85460



1020112164

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EPIDEMIOLOGIA DEL HTLV EN LA AMAZONIA BRASILEÑA.
SEROPREVALENCIA E IDENTIFICACION DEL VIRUS
CIRCULANTE**

T E S I S

**QUE EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA:

LUIS ISAMU BARROS KANZAKI

MONTERREY, N. L.

ENERO, 1995

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EPIDEMIOLOGIA DEL HTLV EN LA AMAZONIA BRASILEÑA:
SEROPREVALENCIA E IDENTIFICACION DEL TIPO CIRCULANTE**

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA PRESENTA
LUIS ISAMU BARROS KANZAKI

COMISION DE TESIS:



Dra. LAURA MARIA TREJO AVILA
DIRECTOR

Dr. REYES SILVESTRE TAMEZ GUERRA
CO-DIRECTOR

Dr. LUIS JESUS GALAN WONG
ASESOR

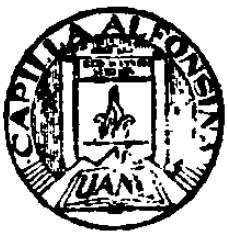


Dra. MARIA DEL SOCORRO FLORES DE CASTAÑEDA
ASESOR

MONTERREY, N. L.

ENERO, 1995.

TD
Z5320
FCB
1995
B3



FONDO TESIS

EN MEMORIA DE MI PADRE Y MIS ABUELOS.
A MI MADRE Y MIS HERMANOS.
A MIS HIJOS.
A MI ESPOSA.

INDICE

| CAPITULOS | PAGINAS |
|--|----------------|
| AGRADECIMIENTOS | VI |
| LUGAR DE REALIZACION | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | IX |
| ORIGEN DE LOS REACTIVOS | XII |
| RESUMEN | XIII |
| 1.INTRODUCCION | 1 |
| 2.OBJETIVOS | 3 |
| 3.IMPORTANCIA | 4 |
| 4.ANTECEDENTES | 5 |
| 4.1.BIOLOGIA DE LOS RETROVIRUS | |
| 4.1.1.CLASIFICACION DE LOS RETROVIRUS | |
| 4.1.2.GENOMA DEL VIRUS | |
| 4.1.3.VARIANTES GENOMICAS Y EVOLUCION DE LOS PTLVs | |
| 4.1.4.ETIOPATOGENESIS DEL HTLV-I | |
| 5.MATERIAL Y METODOS | 18 |
| 5.1.FUNDAMENTOS Y DESCRIPCION DE LAS METODOLOGIAS EMPLEADAS | |
| 5.1.1.COLECTA DE MUESTRAS DE SANGRE | |
| 5.1.2.PRUEBAS SEROLOGICAS EMPLEADAS PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I/II | |
| 5.1.2.1.METODO DE AGLUTINACION PASIVA CON PARTICULAS DE GELATINA (PA) | |
| 5.1.2.2.METODO DE ELISA | |
| 5.1.2.3.METODO DE ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA | |
| 5.1.3.ANALISIS DE ACIDO NUCLEICO VIRAL | |
| 5.1.3.1.EXTRACCION DE FRAGMENTOS DE DNA DEL SUERO/PLASMA | |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.3.2.AMPLIFICACION ENZIMATICA DE FRAGMENTOS DE DNA | |
| 5.1.4.ANALISIS ESTADISTICO | |
| 6.RESULTADOS | 28 |
| 6.1.ANALISIS DE POBLACION | |
| 6.2.ANALISIS SEROLOGICO | |
| 6.3.ANALISIS MOLECULAR | |
| 6.4.ANALISIS ESTADISTICO | |
| 7.DISCUSION | 33 |
| 8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 47 |
| 9.APENDICE | 49 |
| TABLA 1-14 | 50 |
| FIGURAS 1-23 | 64 |
| 10.BIBLIOGRAFIA | 87 |

AGRADECIMIENTOS

A NUESTRO CREADOR.

A LOS PACIENTES Y VOLUNTARIOS QUE DONARON SUS MUESTRAS DE SANGRE.

A MIS ASESORES, Dra. LAURA TREJO AVILA, Dr. REYES TAMEZ, Dr. LUIS GALAN Y Dra. FLORES CASTAÑERA QUE ME PERMITIERON CON SU AYUDA A CONCLUIR ESTA TESIS.

A LA INICIATIVA Y PRIMEROS PASOS EN LA RETROVIROLOGIA QUE DEBO AL Dr. KOSHI MARUYAMA.

A LA Dra. CRISTINA PADILLA, A Dra. JULIA VERDE Y A Sra. CRISTINA POR EL APOYO PROPORCIONADO.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA U.A.N.L. Y A LA ESCUELA DE POSTGRADO.

A FUJIREBIO INC. POR LA DONACION DE LOS KITS DE PA; A EMBRABIO POR LA DONACION DE LOS KITS DE ELISA Y WESTERN BLOT; Y AL CENTRO INTERNACIONAL DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR POR LA BECA OTORGADA .

AL M.C. CARLOS LEAL Y Dr.FUENTES PENSAMIENTO POR LOS INTENTOS INICIALES DE LA TESIS EN CITOGENETICA HUMANA Y HEMOBLASTOSIS EN INFANTES.

A LA Dra. MARUCIA AMORIM POR SU APOYO EN MOMENTOS DIFICILES.

AL INCANSABLE AMIGO JORGE CASSEB POR SU CONSTANTE ESTÍMULO.

A LOS AMIGOS DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA EN MONTERREY, PABLO & TONI, JUAN ALCOCER, JOSE LUIS, LEONARDO, CARMEN&PATRICIO, RICARDO GOMEZ, MATHI, EDGAR, ESTER TREVIÑO, CATARINO, BERTA, ARTURO,

**PACO Y ARACELI POR LA AMISTAD Y LA AYUDA
CONSTANTE QUE SIEMPRE ME OFERECIERON.**

**AL M.C. ANTONIO HEREDIA Y A Dr. PAUL EARL POR
LOS CONSEJOS Y COLABORACION INVALUABLE.**

**AL Dr. ALEXANDRE LINHARES, Dra. CELIA NAKAUTH,
Dra. OLINDA MACEDO, Dra. LOURDES GOMES, Dr.
JORGE TRAVASSOS Y Dra. AMELIA TRAVASSOS Y A LA
SRA. CEREJA NAKAUTH, LAURA NAKAUTH Y A
BIBLIOTECARIA NAZARIA HIGASHI, A TODOS LOS
AMIGOS DEL INSTITUTO EVANDRO CHAGAS POR LA
AYUDA PRESTADA.**

**AL Dr. A.P.C. MUNIZ DEL CENTRO NACIONAL DE
PRIMATES Y Dr. REINALDO AMORIM DEL BIOTERIO
DE ANIMALES DEL INSTITUTO EVANDRO CHAGAS.**

**AL Dr. JOÃO EMILIO MACEDO, A Dra. MAKINO, A LAS
ENFERMERAS Y MEDICOS DEL INSTITUTO OFIR
LOIOLA.**

**AL Dr. CLAUDIO MADAZZI Y HERMANA TERSINHA DE
LA CASA DE HOSPITALIDAD DE SANTANA, AMAPA,
BRASIL.**

**AL FINAL, A TODOS QUE HAYA OMITIDO, MI
MUCHISIMO "OBRIGADO".**

LUGAR DE REALIZACION DE LA TESIS

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología “Dr. Sergio Estrada Parras”, Departamento de Microbiología e Inmunología, FCB, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México; Laboratorio de Citogenética Humana y Virología, Departamento de Biología/Patología, CCB, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil; Laboratorio de Referencia de HIV/AIDS, Instituto Evandro Chagas, Ministerio de la Salud, Belém, Pará, Brasil; Departamento de Patología, Centro de Cancerología de Chiba, Chiba, Japón.

Las muestras de sangre humana fueron colectadas en el municipio de Santa Cruz de Arari, Isla de Marajó, Pará; en el Hospital de Cancerología “Instituto Ofir Loiola”, Belém, Pará; en el Banco de Sangre de Belém, Pará; en el Laboratorio de Citogenética Humana y Virología, CCB, UFPA; en el Laboratorio de Referencia para HIV/AIDS, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará; en el municipio de Tomé-Açú, Pará; en el municipio de Santa Izabel de Pará, Pará y en el municipio de Santana, Amapá, Brasil.

Las muestras de suero de amerindios amazónicos fueron gentilmente proporcionadas por el Laboratorio de Genética de Poblaciones, CCB, Universidade Federal do Pará.

Las muestras de suero de los simios amazónicos y africanos fueron colectadas en el Centro Nacional de Primates, Ministerio de la Salud, Belém, Pará, Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3'OH: Radical hidroxila del Carbono 3 de la Desoxirribose.
- 5'-GAG-POL-ENV-pX-3': Organización del genoma del HTLV-I.
- ANTI-IGg: Inmunoglobulina con especificidad en contra la inmunoglobulina G humana.
- ARBOVIRUS: "Arthropod Born Viruses" virus que posee ciclo de síntesis viral en artrópodos.
- ATG: Secuencia nucleotídica del ácido desoxirribonucleico con la inicial de los nucleótidos Adenina, Timina y Guanina.
- ATLL: Leucemia/Linfoma de linfocitos T de adultos.
- BANDAS G: Regiones cromosómicas transversales obtenidas de cromosomas metafásicos con tinción específica.
- CAPPING: Secuencia específica de nucleótidos en el RNA mensajero que impide la modificación de la información génica.
- CD4: Antígenos de superficies de linfocitos que caracterizan específicamente las subpoblaciones de T cooperadores.
- CSPD: Sustrato quimioluminescente para la fosfatasa alcalina; Disodio 3-(4-metoxispirol{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{1,7}]decan}-4-il)fenil fosfato.
- D.O : Absorbancia expresada en densidad óptica.
- DNA: Acido desoxirribonucleico.
- dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP): desonucleótidos trifosfatos, deoxiadenosina /deoxiguanosina/deoxicitosina/deoxitimidina trifosfatos.
- EDTA: Acido etilendiaminoacético.
- ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" ensayo inmunoenzimático.
- ENV: Región genómica del HTLV que codifica para proteínas de la envoltura viral.
- FUNAI: Organización del Gobierno Brasileño, Fundación Nacional de Asistencia al Indio.
- GAG: Región genómica del HTLV que codifica para las proteínas del cápside viral.
- GGC: Secuencia nucleotídica del ácido desoxirribonucleico para las bases nucleotídicas guanina, guanina y Citosina.
- gp21: glicoproteína con peso molecular de 21 Kd, situada transmembranalmente a la envoltura viral de HTLV-I.
- gp46 : glicoproteína con peso molecular de 46 Kd, situada externamente a la envoltura viral de HTLV-I.
- gp61/68: glicoproteína precursora de HTLV-I de 61 a 68 Kd, que es clivada en residuos menores de 21 y 46 Kd.
- HAM: Mielopatía asociada al HTLV-I.
- HBV: Virus de la Hepatitis B.
- HIV-I, II: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I y II.
- HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos.
- HLA-Bw62: Tipo específico de antígeno del HLA, todavía aun por definirse "W" (workshop).

- HLA-DQw3: Tipo específico de antígeno del HLA, todavía aun por definirse “W” (workshop)
- HLA-DRB1: Tipo específico de antígeno del HLA.
- HRES-1: Secuencias endógenas relacionadas al HTLV-I.
- HTLV: Nombre genérico de los retrovirus humano con tropismo por linfocitos T.
- HTLV-I: Retrovirus Humano con tropismo por linfocitos T tipo I.
- HTLV-II: Retrovirus Humano con tropismo por linfocitos T en que no se determinó si es del tipo I o II.
- HTLV-III: Retrovirus Humano con tropismo por linfocitos T del tipo II.
- IF: Prueba serológica de Inmunofluorescencia.
- IgGFab: Porción Fab de la inmunoglobulina, la cual se compleja al antígeno.
- JK: Cadena de unión de inmunoglobulinas multiméricas.
- LiCl: Cloruro de Litio.
- LINFOCITOS B: Subpoblaciones de linfocitos, precursores de plasmocitos y células de memoria.
- LINFOCITOS T: Subpoblaciones de linfocitos involucrados en la regulación y expresión de la respuesta inmunológica celular.
- Lma-66: Línea establecida de linfocitos expresando antígenos de T y B, infectadas naturalmente con HTLV-I y el virus de Epstein-Barr, de un paciente japonés con leucemia de linfocitos T de adultos.
- LTR: Secuencia repetitiva terminal presente en los extremos terminales de retrovirus.
- MMTV: Retrovirus del tumor mamario de ratones.
- NaOH: Hidróxido de sodio.
- NBT-BCIP: Azul de Nitrotetrazolio- 5-Bromo-4-cloro-indolil fosfato.
- nm: Nanómetro, 10^{-6} milímetros.
- NONIDET p40: Solubilizante de proteínas.
- p19: proteína de 19 Kd del core del HTLV-I.
- p24: proteína de 24 Kd del core del HTLV-I.
- p40tax: proteína de 40 Kd de la región pX del genoma del HTLV-I.
- p55/53: proteína de 55 a 53 Kd precursora de las proteínas de core del virus.
- PA: Método serológico de aglutinación con partículas de gelatina para la detección de anticuerpos anti-HTLV-I.
- PCR: Amplificación génica en cadena.
- pfu: DNA polimerasa de una bacteria, *Pyrococcus furiosus*.
- poliA: Secuencias repetitivas de Adenina que ocurre en el RNA mensajero.
- PRIMERS: Secuencias que señalan el inicio de la replicación del ácido nucleico.
- PTLV: Denominación genérica de los retrovirus de primates con tropismo por linfocitos T.
- REX: Proteína del HTLV-I codificada por la región pX.
- RIP: Metodología serológica de Radioinmunoprecipitación.
- RNA: Ácido ribonucleico.
- RNAr: Ácido ribonucleico ribosómico.
- RNAsa: Enzima con actividad ribonucleásica.
- RNAt: Ácido ribonucleico transportador o de transferencia.

- RPM: Rotaciones por minuto.
- S: Unidad Sverdeberg para medir la migración de moléculas en un campo gravitacional bajo rotación.
- SDS: Dodecíl Sulfato de Sódico.
- SIDA/AIDS: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida.
- SOUTHERN BLOT: Método par la detección de secuencias de DNA en agarose.
- SSCP: Polimorfismo Conformacional de Cadenas Simple de DNA
- STLV-I: Retrovirus simio con tropismo por linfocitos T, tipo I.
- TAA: Secuencia nucleotídica de Timina, Adenina y Adenina.
- TAX: Secuencia génica del HTLV-I y II.
- TCGF, TAC: Factor de crecimiento para linfocitos T o interleucina 2.
- TCL-Kan.: Línea de células T infectadas con el HTLV-I de un acarreador del virus.
- TRANS: Mecanismo de activación génica por medio indirecto.
- TSP: Paraparesia Tropical Espástica.
- U3/R/U5: Secuencia regulatoria de retrovirus contenidas en el LTR.
- USPHS: Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica.
- WB: Western Blot o Inmunoelectrotransferencia.

ORIGEN DE LOS REACTIVOS

- FUJIREBIO INC., TOKYO, JAPON. KIT DE PRUEBA DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE GELATINA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I.
- CELLULAR PRODUCTS, BUFALLO, NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. KIT DE ELISA PARA LA DETCCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I.
- EMBRABIO, SÃO PAULO, SÃO PAULO, BRASIL. KIT DE WESTERN BLOT PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I.
- SIGMA CHEMICAL Co., ST. LOUIS, MISSOURI, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. ACEITE MINERAL, CLORURO DE LITIO, ETANOL, ACETONA, TRIS-HCL, ACIDO BORICO, EDTA, DNA DE ESPERMA DE SALMON.
- WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD, OSAKA, JAPON. KIT PARA LA EXTRACCION DE DNA.
- STRATAGENE, LA JOLLA, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. PFU DNA POLIMERASA.
- AT BIOCHEM, INC., MALVERN, PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. GEL HYDROLINK D 600.
- BOEHRINGER MANNHEIM, GmbH, ALEMANIA. KIT PARA LA CONJUGACION DE LA TRANSFERASA TERMINAL A DNA, REACTIVO BLOQUEADOR PARA LA HIBRIDACION Y DETECCION DE ACIDO NUCLEICO, FRAGMENTOS FAB ACOPLADO A ANTI-DIGOXIGENIN-AP.
- TROPIX, BEDFORD, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. SUSTRATO QUIMIOLUMINESCENTE, CSPD.
- KODAK DIAGNOSTIC FILM, ROCHESTER, NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. PELICULA X OMAT AR GBX-2.
- PERKIN-ELMER CETUS, NORWALK, CONNECTICUT. PRIMERS Y SONDAS PARA LA DETECCION DE SEGMENTOS DE GAG Y ENV DE HTLV-I Y TAX DE HTLV-I/II. (VER TABLA 4-5).

Resumen.

Hace ya más de una década que Poiesz *et al.*¹ aislaron el primer retrovirus involucrado en neoplasias humanas, el virus humano tipo I con tropismo por linfocitos T (HTLV-I).

Dos enfermedades, la Leucemia/Linfoma de Linfocitos T de adultos (ATLL), de carácter neoplásico, y la Paraparesia Tropical Espástica (TSP) o la Mielopatía Asociada al HTLV-I (HAM), patología crónico-degenerativa, fueron etiológicamente vinculadas al HTLV-I.²

En Japón, se detectaron las áreas de mayor endemicidad al HTLV-I y a las enfermedades que causaban, ATLL y HAM.^{3,4} El Caribe y Africa Central, también se revelaron como áreas de elevada incidencia del virus.^{5,6}

Estudios más recientes han detectado alta seroprevalencia del HTLV-I en Sudamérica e Islas del Pacífico sur, y curiosamente, entre los aborígenes de estas áreas.^{7,8} Otras áreas de menor endemicidad fueron encontradas en diferentes partes del mundo, asociando algunos investigadores este hallazgo, a la migración de individuos de la raza negra a diferentes continentes, por creer que el virus se haya originado en Africa.^{9,10} Sin embargo, los hallazgos de alta seroprevalencia del HTLV-I entre aborígenes, en Sudamérica,⁷ Centroamérica,¹¹ Pacífico sur,⁸ Japón,³ Filipinas,¹² Taiwan¹³ y Rusia,¹⁴ provocan una polémica acerca del tema.

En 1982, Kalyanaraman *et al.*¹⁵ detectaron un retrovirus altamente relacionado antigénicamente al HTLV-I, denominado HTLV-II. Pruebas serológicas y de análisis molecular han demostrado que en muchas áreas en que se creía estar circulando el HTLV-I, en realidad está presente el HTLV-II o otro retrovirus antigénicamente relacionado. Actualmente hay mucha controversia en cuanto al papel del HTLV-II en patologías humanas.^{16,17}

Datos preliminares obtenidos por nosotros en colaboración con Maruyama, en que se demuestra la presencia de anticuerpos solamente en contra de péptidos del GAG del HTLV-I/II, no fueron suficientes para convencer a la comunidad científica de la existencia del HTLV en la Amazonia brasileña.⁷ En este trabajo se confirma la circulación

del HTLV-I, bajo la demostración de anticuerpos anti-HTLV-I para el GAG, ENV y p40tax, así como la amplificación y detección de regiones génicas del virus en el suero de individuos HTLV-I seropositivos.

La tasa general de prevalencia para anticuerpos anti-HTLV-I es de 0.56 % (12/2,131), distribuidos entre pacientes neoplásicos 1.17 % (4/390), individuos del grupo control 0.38 % (3/770), profesionales de salud 1.76 % (3/170), amerindios amazónicos 0.21 % (1/487) y familiares de individuos HTLV-I seropositivos, 14.28 % (2/14)*; los otros grupos que fueron estudiados, inmigrantes japoneses y sus descendientes(100), pacientes con enfermedades neurológicas (37), pacientes con enfermedades ginecológicas (104), pacientes con genopatías y sus progenitores (60) y pacientes con neuropatías (37), todos resultaron seronegativos al HTLV-I. La seroprevalencia general para el HTLV-I disminuyó a 0.49 % cuando se sumó a la población de 2,131 individuos, otras 684 muestras que fueron únicamente sometidas a ELISA, los cuales estaban distribuidos en: un grupo de HIV seropositivos con una seroprevalencia de 0.63 % (2/316) y ningún seroreactor entre pacientes con malaria (0/168) y donadores de sangre (0/200).

Los simios amazónicos resultaron seronegativos a HTLV-I (0/134), mientras que 8.33 % (2/24) de los simios africanos presentaron anticuerpos anti-HTLV-I/STLV-I.

El hallazgo más interesante fue la alta seroprevalencia para el HTLV-I, de 63.63 % (7/11) entre profesionales de salud y pacientes neoplásicos, expuestos largo tiempo a la radiactividad.

Hubo una mayor incidencia de infección por el HTLV-I entre mujeres 75 % (9/12), particularmente entre pacientes con neoplasia cervicouterina. Entre individuos del grupo control, se halló un foco de infección por el HTLV-I en una villa pesquera en la isla de Marajó, en la desembocadura del río Amazonas.

Nuestros datos sugieren que el HTLV-I no sea autóctono entre amerindios amazónicos y que exhibe limitada variación antígeno-genómica en relación a los prototipos del HTLV-I circulante en el mundo.

*Hubo un individuo HTLV-I seropositivo que fue clasificado simultáneamente como Profesional de salud y familiar de individuo HTLV-I seropositivo.

1. Introducción.

Los virus, por sus características peculiares de parásitos intracelulares, se posesionan de la maquinaria bioquímica de la célula para la síntesis de sus moléculas y, en algunos casos, integran su material genético en el DNA del cromosoma de la célula hospedera, alterando la expresión de los genes celulares, empezando muchas veces en este momento el mecanismo oncogénico^{18,19}.

En los animales, hay un gran número de virus involucrados en procesos neoplásicos, mientras que, en el hombre, se conocen pocos virus, en que comprobadamente se ha observado la relación causa-efecto, entre virus y oncogénesis^{20,21}.

Actualmente se sabe que el virus de Epstein-Barr esta etiológicamente relacionado con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo²². Además de este, se podría mencionar los papilomavirus, en los que se ha detectado la integración y expresión de su genoma en células neoplásicas del cerviz uterino²³; los virus de la Hepatitis B (HBV) y de la Hepatitis C, involucrados como agentes etiológicos del hepatocarcinoma celular²⁴, y el HTLV-I, el agente etiológico de Leucemia/Linfoma de Linfocitos T de Adultos¹².

En relación a otros virus que podrían estar involucrados en la etiología de neoplasias humanas, todavía, no se tiene datos concluyentes, como por ejemplo, ocurre con el Herpes Simplex tipo I y el Herpes Simplex tipo II y los Adenovirus^{19,20}.

Distintos son los mecanismos por los cuales los virus inducen el proceso neoplásico. Los virus DNA de una manera general dependen de la expresión directa de determinados loci génicos propios para el desarrollo del proceso neoplásico²⁰. Los RNA virus, representados por el gran grupo de los retrovirus, en su gran mayoría traen en su genoma, recombinantes de oncogenes que cuando infectan células hospederas, inducen el proceso neoplásico²⁵. Otros retrovirus, como el HTLV-I, II y el virus de la leucemia bovina no acarrean oncogenes, pero inducen el proceso neoplásico, mediado por genes propios con función reguladora de la expresión viral y, que por "accidente" o tropismo se dirigen a los genes celulares, activando de una forma patológica mecanismos involucrados en la proliferación y diferenciación celular^{18,21}.

La asociación etiológica del HTLV-I con el TSP/HAM fue uno de los factores que incitaron estudios epidemiológicos del HTLV-I en Sudamérica, particularmente en áreas de elevada incidencia de TSP, como en la región norte^{2,10}.

Los retrovirus de primates con linfotropismo T, PTLV, (HTLV-I, HTLV-II y STLV-I) derivan de un ancestral común, y el hecho que la variabilidad genética de un PTLV sea directamente proporcional al tiempo que este agente esta circulando en una población²⁶, ha proporcionado información para estudios de antropología física, particularmente en las rutas de migración del hombre y simios entre los continentes, así como en la comprensión de los mecanismos de evolución de los protooncogenes²¹. Por otro lado, no está muy claro el papel de los PTLVs en la patogénesis de las enfermedades que se les atribuye²⁵.

Basado en lo anteriormente expuesto, nosotros en colaboración con Maruyama, realizamos estudios preliminares y pioneros, con el objeto de detectar la presencia del HTLV en la Amazonia brasileña⁷. Sin embargo, es reciente el cuestionamiento en cuanto a la clasificación del oncornavirus humano y, algunos investigadores todavía no aceptan una subdivisión del HTLV en tipos I y II, basado en la hipótesis de que, dependiendo del grado de maduración del virion en la célula y su interacción con los antígenos de histocompatibilidad humano, se determina esta subdivisión en HTLV-I y HTLV-II, con un ancestral común a ambos.

Este trabajo de tesis planteó esclarecer las dudas referentes a los primeros datos obtenidos sobre la existencia del HTLV en la Amazonia brasileña, y extenderse un poco más, tratando de determinar qué tipo de HTLV circula, su prevalencia en diferentes áreas y en diferentes poblaciones humanas.

2. Objetivos.

Identificación del HTLV circulante y mapeo de las zonas endémicas en poblaciones humanas de la Amazonia brasileña.

2.1. Objetivos específicos:

a) Determinar la seroprevalencia del HTLV entre distintas poblaciones de la Amazonia brasileña.

b) Detectar el genoma proviral del HTLV en el DNA de linfocitos de individuos seropositivos al virus y comparar el provirus con los prototipos del HTLV-I y HTLV-II.

c) Clasificar taxonómicamente el virus detectado.

3. Importancia.

Los retrovirus se han vuelto un problema de Salud Pública. El HTLV-I todavía sigue siendo ignorado por las autoridades sanitarias en muchos países de Latinoamérica.

El virus, por su carácter patogénico, etiológicamente involucrado en hemoblastosis y enfermedades neurodegenerativas, es tema de intensa investigación, tanto a nivel epidemiológico como de biología molecular, sin embargo, escasos son los datos seroepidemiológicos que indiquen las áreas de mayor o menor incidencia del virus en Latinoamérica.

Particularmente en la región Amazónica, Black *et al.* (datos no publicados), nosotros en colaboración con Maruyama⁷ y Kanzaki *et al.*²⁷ reportan la detección de anticuerpos para el HTLV-I en diferentes grupos de aborígenes y poblaciones urbanas. Sin embargo, el perfil de la respuesta inmune al virus, de los individuos supuestamente HTLV-I seropositivos no esclarecen si es realmente un HTLV.

El patrón genético de los individuos y las diferentes variaciones antigénico-genómicas del HTLV, reflejan diferencias en el tropismo viral y la respuesta del hospedero obviamente determinando las variadas manifestaciones clínicas de la infección por el HTLV.

Los datos que se obtengan referentes a variación génica del HTLV circulante en la Amazonia brasileña situaría el virus entre otras cepas en el mundo, aportando información que podría contribuir a dilucidar el origen y ruta de evolución de los HTLV y también en estudios relacionados al origen y migración del hombre en el continente americano, además de que, el comportamiento del virus en las distintas poblaciones en que se encuentre nos informa algo acerca de las características de la relación parásito-huésped que podría proporcionar datos para medidas profiláticas a infección por el HTLV, no sólo en Brasil sino también en otras áreas en el mundo.

Por otro lado, evidencias que demuestren la circulación del virus en las poblaciones rurales y urbanas, convencerían a las autoridades del Ministerio de Salud a volver obligatorias las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-HTLV en Bancos de sangre y congéneres a fin de prevenir la diseminación del virus.

4. Antecedentes.

Los factores y mecanismos que llevan a una neoplasia son diversificados, numerosos y en la gran mayoría poco comprendidos^{20,21,25}. Tratándose de agentes biológicos, específicamente los virus, en el inicio del siglo, Vallée & Carre²¹ demostraron en 1904 que un agente filtrable era responsable de la Anemia Infecciosa Equina. En 1908, Ellerman & Bang²¹ demostraron que la leucemia aviaria y otras neoplasias de tejido hematopoiético podrían transmitirse por virus. Posteriormente, en 1911, Peyton Rous²¹ reveló que un sarcoma podría transmitirse de forma similar en pollos.

En 1942, Bittner²¹ demostró que el "agente de la leche" de ratones era un virus (virus del tumor mamario de ratones, MMTV). En 1951, Ludwik Gross²¹ reportó el aislamiento del primer virus de leucemia de mamíferos, hoy denominado el virus de la leucemia de Gross. A partir de entonces, muchos otros aislamientos de virus se siguieron de una variedad de leucemias y sarcomas de diferentes especies de animales. Sin embargo, el hecho de que, se manipulaba con animales de laboratorio, no convencía a la comunidad científica del papel oncogénico de los virus, hasta que, de felinos salvajes y domésticos se aisló el virus etiológicamente relacionado con neoplasias, el virus del sarcoma/leucemia de felinos^{25,28}.

Aunque, en todas las escalas zoológicas de vertebrados y hasta de primates no humanos se había aislado virus tumorigénicos²¹, la búsqueda incesante de virus oncogénicos en el hombre culminó con la visualización por Aschong, Epstein y Barr²² de partículas virales por microscopía electrónica en células cultivadas a partir de linfoma de Burkitt de un niño africano en 1964. Sin embargo, sólo recientemente se pudo afirmar que el virus de Epstein-Barr está involucrado en la etiología del linfoma de Burkitt así como del carcinoma nasofaríngeo²⁹.

Los primeros virus con los cuales se pudo establecer el vínculo etiológico con neoplasias fueron denominados oncornavirus, por tener su material genético constituido de RNA²¹. En el hombre, el primer virus relacionado etiológicamente con neoplasias posee DNA como material genético²². El aislamiento de RNA virus de neoplasias ocurrió después que Baltimore³⁰, Temin y Mizutani³¹, en 1970, demostraron la presencia de la transcriptasa inversa, una DNA polimerasa dependiente de RNA, imprescindible para la

síntesis de DNA viral tomando como molde el RNA viral y para la propia integración del DNA viral en el cromosoma de la célula hospedera. En principios de los años 70, la existencia de retrovirus humanos era todavía muy discutida. Sin embargo, en aquel entonces, Hehlmann *et al.*³² en 1972, obtuvieron evidencias experimentales de la presencia de retrovirus humanos, en base a la demostración de la actividad de la transcriptasa inversa endógena asociada a un RNA de 70 S en extractos de citoplasma humano. También, como factor decisivo para el aislamiento de los RNA virus oncogénicos, se menciona la caracterización y uso de la interleucina 2 por Mier *et al.*³³, en cultivo de linfocitos, logrando cultivos de larga duración, indefinidos, lo que permitió, en 1980, después de muchos intentos a Poiesz *et al.*¹, aislar y caracterizar el primer virus RNA humano oncogénico, ahora denominado HTLV-I, de un paciente con linfoma cutáneo (linfoma de linfocitos T) y posteriormente, el tipo II, fue también aislado en los E.U. en 1986, del bazo de un paciente con una variante de Leucemia de Linfocitos T Pilosos. El HTLV-II presenta cerca de 60 % de homología del ácido nucleico con el HTLV-I. El HTLV-II no ha sido asociado definitivamente con ninguna patología, sin embargo, el aislamiento del virus de dos pacientes con una variante muy rara de leucemia de células pilosas sugieren un papel potencial del virus en cuadros linfoproliferativos^{15,16}. Actualmente los retrovirus han sido descritos en animales de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo peces, anfibios e insectos²¹.

4.1. Biología de los Retrovirus.

4.1.1. Clasificación de los Retrovirus.

Los oncornavirus actualmente reciben la denominación de Retrovirus, por el hecho de que acarrean en su estructura y codifican en su genoma, la transcriptasa inversa²⁸.

Los virus RNA que poseen la transcriptasa inversa, están clasificados en la familia Retroviridae, constituida de las subfamilias oncovirinae, lentivirinae y spumavirinae, abarcando un largo espectro de hospederos, desde los invertebrados a los vertebrados²¹.

En la subfamilia oncovirinae están agrupados los virus que inducen una amplia gama de neoplasias; fueron los primeros virus asociados con cáncer. Muchos de estos virus

son agentes neoplásicos obligatorios, acarreando en su genoma oncogenes, responsables para el desarrollo del proceso neoplásico. Los oncovirus están subagrupados en los tipos A, B, C y D de acuerdo a propiedades morfológicas específicas, inicialmente descritas por Bernhard con el empleo de la microscopía electrónica. Las partículas del tipo A carecen de poder infectivo y sólo han sido observadas en el interior de la célula. Poseen estas partículas un core electrón-lúcido recubiertas por una doble envoltura, generalmente de 60-90 nm de diámetro. Estas partículas encontradas en las cisternas celulares, pueden ser observadas en células que producen partículas del tipo C y D, sin embargo, no se comprende su papel en la morfogénesis de los retrovirus. El prototipo de este subgrupo, es el virus de ratón tipo A ²¹.

Las partículas del tipo B exhiben pleomorfismo durante su brote a través de la membrana celular. Estas partículas poseen largas espículas glicoproteicas, aún cuando su nucleocore está preso a la membrana. Después del brote, las partículas maduras presentan nucleoides electrón-densos, excéntricamente localizados. El prototipo de este subgrupo es el virus del tumor mamario de ratones, MMTV ²¹.

Las partículas del tipo C sólo han sido observadas cuando empiezan a brotar a través de la membrana celular. Durante el brote, los core electrón-densos se tornan electrón-lúcidos y se observan las espículas glicoproteicas virales recubriendo la membrana plasmática, que envuelve el core viral. Dos formas de partículas han sido descritas, las formas inmaduras, con core electrón-lúcido y maduras con core electrón-denso. El virus de la leucemia de ratones es el representante de este subgrupo ²¹.

Viriones del tipo D son observados intracelularmente, en forma de anillos localizados cercanos a la membrana plasmática. Las formas extracelulares presentan el core electrón-denso situado excéntricamente. De la envoltura parten cortas espículas de naturaleza glicoproteica. Como modelo de este subgrupo tenemos el virus de Mason-Pfiser de monos ²¹.

Los lentivirus incluyen agentes que inducen enfermedades neurológicas e inmunodegenerativas, crónicas, con largos periodos de incubación. En esta subfamilia están incluidos el virus de la Anemia Infecciosa Equina, el virus de la Encefalitis-Artritis Caprina, el virus de la Inmunodeficiencia Bovina, el virus de la Inmunodeficiencia Felina, el

virus de la Inmunodeficiencia Humana, tipos 1 y 2, y el virus de Maedi-Visna que es el prototipo de este grupo. Morfológicamente, los lentivirus presentan el nucleoide incompleto durante el brote prematuro y no disponen de una membrana electrónica intermedia. En partículas virales maduras, el nucleoide presenta la forma cilíndrica^{21,28}.

Bajo la denominación de Spumavirus, están los retrovirus que aún no se sabe si inducen algún tipo de proceso patológico "in vivo"²¹. Generalmente son encontrados como contaminantes de cultivos celulares, induciendo lesiones degenerativas vacuolizantes. Estos agentes han sido aislados de células de bovinos, felinos, hamsters y humanos. Presentan partículas nucleoides intracitoplasmáticas que son incorporadas a la superficie celular durante el brote. Las formas maduras poseen nucleoide electrónico con espículas radiantes. De modo general, los retrovirus tienen un diámetro que varía entre 50-150 nm^{25,28}.

4.1.2. Genoma del Virus.

Los retrovirus poseen RNA de cadena simple, dispuesto en dos cadenas idénticas, unidas por un RNAt, de polaridad positiva, similar al RNA mensajero. El complejo dimerico del RNA genómico sedimenta a 60-70 S, presentando secuencias de poli A de cerca de 200 residuos en el extremo 3' terminal y "capping" típico en el 5' terminal. Además de su RNA diploide y el RNAt, los retrovirus acarrean RNAr de la célula hospedera^{28,34}.

La transcriptasa inversa, con función polimerasa, RNasa, endonucleasa e integrasa, transcribe el RNA viral genómico en un híbrido, DNA-RNA. La cadena negativa del DNA es utilizada como molde para la transcripción de la doble cadena de DNA, mientras que la cadena de RNA es degradada por actividad ribonucleásica de la enzima. El DNA genómico se circulariza y es transportado al núcleo celular integrándose al DNA cromosómico de la célula hospedera, mediada por la actividad integrasa de la transcriptasa inversa^{21,25,28}.

El RNA genómico del HTLV-I se constituye de 9,032 nucleótidos y posee en sus extremos, secuencias terminales repetitivas largas de 754 nucleótidos (LTR). Las terminaciones repetitivas largas son responsables para la integración del DNA proviral

en el DNA celular. La longitud inusual del LTR se debe a largas regiones de U3/R/U5, que juegan un papel importante en la integración del DNA proviral y también en la regulación de la transcripción del genoma proviral^{34,35}.

La estructura genómica del HTLV-I se organiza en la siguiente forma: 5'-gag-pol-env-pX-3', estas regiones génicas están presentes en otros retrovirus replicativo-competentes, con excepción de la región pX. El gen gag que se inicia en ATG, en la posición 802 y termina en TAA, en la posición 2089, codifica para una proteína fosforilada precursora, p55/53, que es procesada en 4 proteínas internas estructurales, p28, p24, p19 (fosforilada) y p15. La región pol, que se inicia con GGC, en la posición 2498, y termina en TAA, en la posición 5185, codifica para la transcriptasa inversa, originando productos poliproteicos de 180-200 kd, procesada en una proteína de 90 Kd. El producto de env, gp61/68, es procesado en polipéptidos que son glicosilados originando gp46 y gp21 localizados al exterior y transmembranalmente al virion respectivamente³⁵.

El HTLV-I y el -II, como también el virus de la Leucemia Bovina presentan una región abierta de lectura, pX, que en diferentes fases codifica para 3 proteínas distintas, que en el HTLV-I son designadas tax (p40), rex (p27) y p21, las cuales regulan la replicación y expresión de genes virales y celulares^{28,35}.

El LTR del HTLV-I contiene un potenciador de la transcripción, consistiendo de tres repeticiones directas de 21 pares de base que son sitios de acción indirecta en "trans" de la p40tax. La acción transactivadora de la p40tax sobre los genes celulares de la interleucina 2 y la subunidad α del receptor para la interleucina 2 (TCGF, antígeno TAC) induce la proliferación indefinida de los linfocitos T cooperadores contribuyendo al desarrollo del proceso neoplásico³⁶. Experimentalmente se ha obtenido la activación de otros genes celulares también involucrados en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación^{36,37,38}.

Métodos serológicos usuales (ELISA, PA, WB) no distinguen el HTLV-I del HTLV-II. La reactividad inmunológica cruzada es más acentuada entre los péptidos codificados por la región GAG del genoma de estos viriones. Aunque la secuencia

nucleotídica del env de estos viriones presenten cerca de 65 % de homología, es baja la seroreactividad cruzada entre los péptidos codificados por esta región^{15,16,17}.

Las secuencias terminales repetitivas (LTR) de estos viriones presentan muy baja homología, excepto en estrechos segmentos de oligonucleótidos localizados en dominios funcionales como la región promotora, estimuladora de transcripción (enhancer) y terminadora de la transcripción³⁹.

4.1.3. Variantes Genómicas y Evolución de los PTLVs.

Bajo la designación de PTLV (Primate T-lymphotropic viruses), están los retrovirus del grupo C con tropismo por linfocitos T, que engloban virus que infectan primates humanos y no humanos, siendo distintamente denominados HTLV-I HTLV-II y STLV-I⁴⁰.

Entre las diferentes variantes del HTLV-I en el mundo (Asia, Africa, Estados Unidos, Caribe y Melanesia), el análisis de la secuencia nucleotídica ha demostrado variación genómica de aproximadamente 5 a 10 % entre ellos, siendo más significativa la variación con el hallazgo hecho en Melanesia⁴¹.

Los prototipos del HTLV-I y el HTLV-II comparten cerca de 62 a 65 % de su secuencia proviral³⁹.

Basándose en las diferencias en los sitios de restricción de endonucleasas (polimorfismo de restricción enzimática), el mapa físico del genoma de diferentes aislados del HTLV-II provenientes de los E.U.A., en diferentes etnias (afroamericano, caucásico e hispano) demuestra que hay cerca de 5 % de variación en el genoma de estos viriones, llevando a creer que hay por lo menos dos subtipos⁴².

El STLV-I, retrovirus simio con linfotropismo T, aislado de primates no humanos de Asia y Africa, ha sido clasificado muy cercano al HTLV-I, presentando entre 90 a 95% de homología entre sus secuencias nucleotídicas⁴⁰.

Intentando trazar las rutas de evolución de los PTLVs, a partir de datos obtenidos de la evaluación del grado de homología entre las regiones más conservadas y variables de sus genomas, el HTLV-II parece haber divergido del ancestral común al HTLV-I y STLV-I en un pasado remoto, mientras que el STLV-I asiático se segregó posteriormente

y el STLV-I africano y el HTLV-I se separaron más recientemente, llevando Poiesz⁴¹ a soportar la hipótesis de que el STLV-I y el HTLV-I se hayan originado en Asia y que la transmisión interespecies haya ocurrido en Africa, en oposición a lo que sostiene Gallo⁴², pues, según él, entre las diferentes variantes del HTLV-I en el mundo, las aisladas en Africa ecuatorial presentan elevado grado de variación en sus genomas, por haber estado más tiempo interaccionando con el genoma de sus hospederos, sufriendo por lo tanto numerosos cambios en su secuencia nucleotídica. Sin embargo, queda aún indefinido el origen de los PTLVs, debido al hecho que, todavía en muchas regiones en el mundo en donde se ha detectado serología positiva para los HTLVs, no se ha aislado el virus, ni tampoco analizado su forma proviral^{26,41}.

Diversas técnicas de análisis de ácido nucleico se han empleado para la detección de variaciones en el genoma de PTLV, metodologías estas muchas veces complejas y trabajosas. Técnicas más sencillas que trataban de resolver pequeñas variaciones en el ácido nucleico viral por manipulaciones en las condiciones de la corrida electroforética resultaron satisfactorias y recientemente empezaron a ser aplicadas en la búsqueda de variaciones génicas de HTLV. En este trabajo de tesis tratamos de probar el empleo del análisis de polimorfismo conformacional de cadenas simple de DNA (SSCP) para la detección de variaciones en el genoma de HTLV^{43,44}. El SSCP, como el nombre indica, se basa en la separación de cadenas simple de DNA en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, por lo tanto es un método sencillo para la detección de la presencia de mutaciones en un segmento de DNA⁴³.

4.1.4. Etiopatogénesis del HTLV-I.

Los retrovirus que infectan al hombre están incluidos en la subfamilia oncovirinae (HTLV-I y HTLV-II) y lentivirinae (HIV-I y HIV-II)³⁴.

El HTLV-I fue el primer retrovirus aislado, en 1980 por Poiesz *et al.*¹, a partir de cultivo de linfocitos de un paciente con una forma agresiva de neoplasia, "micosis fungoide", más tarde reconocida como Leucemia/Linfoma de Linfocitos T. Luego se asoció el HTLV-I con una enfermedad endémica en el Sur de Japón³⁵, la Leucemia/Linfoma de Linfocitos T de adultos, descrita por primera vez en 1977 por Takatsuki *et al.*⁴⁵

Estudios seroepidemiológicos revelaron otras áreas endémicas a este virus en las Islas del Caribe⁵ y en Africa Central⁶. Más recientemente, en Sudamérica e Islas del Pacífico sur se detectaron áreas de pronunciada endemidad a una probable diferente cepa del HTLV, pero muy relacionada antigénicamente, entre aborígenes nativos de estas áreas^{7,8}. Varios trabajos han reportado niveles elevados de seroprevalencia al HTLV-I/II entre aborígenes en diferentes áreas del mundo, comparados a otros grupos étnicos^{12,13,28}.

Además de la Leucemia/Linfoma de Linfocitos T, el HTLV-I fue relacionado etiológicamente con procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central en Japón, denominado Mielopatías asociadas al HTLV-I (HAM)⁴ y Paraparesia Tropical Espástica (TSP) en el Caribe y Sudamérica¹⁰. El periodo de incubación del virus es muy largo, quedándose latente entre 20 a 40 años, siendo difícil de saber si un individuo seropositivo para el virus, desarrollará en el futuro alguna patología inducida por el virus³⁵. Se ha observado que aproximadamente 1% de los individuos infectados por el HTLV-I, desarrolla alguna enfermedad asociada hasta el momento con el virus⁴⁶.

Algo que se ha observado con frecuencia es la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I entre pacientes con diferentes neoplasias (además de pacientes con ATLL), comparándose a individuos aparentemente sanos^{7,27,47}.

El HTLV-I se comporta como un virus exógeno, transmitido tanto por vía horizontal: contaminación con sangre y/o sus productos infectados con el virus, vía sexual infectando el hombre a la mujer; como vertical: vía transplacentaria y leche materna de la madre al hijo. Debido a ese comportamiento, varios estudios han reportado la infección por el HTLV-I en varios miembros de una familia^{48,49}.

Actualmente se han incrementado de forma importante los niveles de infección por el HTLV-I, en grandes metrópolis, entre individuos adictos a drogas intravenosas, por el uso común de agujas contaminadas y también por el comportamiento sexual de este grupo^{5,50}. El HTLV-I es un virus muy débil, fácilmente destruido en contacto con el medio ambiente, su transmisión como se mencionó, ocurre cuando es acarreado en linfocitos infectados en líquidos y tejidos biológicos. Como todos los retrovirus, posee envoltura que adquiere de la célula hospedera y presenta espículas de naturaleza glicoproteica, cuyos péptidos son de origen viral³⁵.

El virion al brotar a través de la membrana de la célula infectada, presenta un formato esférico. Tiene tropismo selectivo por linfocitos T, CD4 (cooperadores), interaccionando la glicoproteína del virus, gp46, con las células blanco, por medio de la cadena β del receptor de la Interleucina 2. El HTLV-I cuando es cultivado "in vitro", induce la formación de sincicios y células gigantes multinucleadas mediado por la gp21 transmembrana^{34,51}.

Hay trabajos reportando subpoblaciones de linfocitos B naturalmente infectadas, dualmente, con el HTLV-I y el virus de Epstein-Barr. Se cree que linfocitos B previamente transformados por EBV, expresarían en la membrana de sus células, receptores para el virus, comúnmente encontrados en linfocitos T cooperadores⁵².

La Leucemia/Linfoma de Linfocitos T de adultos se presenta como un linfoma, con un espectro único de sintomatología clínica, consistiendo de leucemia, hipercalcemia, infiltración de la piel y también, involucrando a la médula osea. No todos los pacientes exhiben toda esta gama de síntomas. La enfermedad es causada por la proliferación de una clona única de células y usualmente, una copia del genoma del HTLV-I está clonalmente integrada en la población de células leucémicas. Con la aplicación del PCR, bajos niveles de RNA viral han sido encontrados en células periféricas mononucleares de la sangre^{10,53,54}.

La infección vírica provoca disturbios en la función normal de los linfocitos infectados, llevando generalmente a los pacientes con leucemia o linfoma de células T de adultos a un estado de inmunodepresión, volviéndolos susceptibles a diversas infecciones oportunistas^{34,35}.

Las características clínicas básicas de TSP/HAM en diferentes partes del mundo parecen ser uniformes. Aunque el progreso de la enfermedad es gradual en más de 60% de los casos, eventos agudos reminiscentes de lesiones vasculares o mielopatía transversa también han sido descritos⁵⁴. La progresión de la enfermedad es lenta e indolente en muchos de los pacientes, alcanzando un pico de varios años. Los signos neurológicos son consistentes de lugar a lugar e incluye paraparesia espástica o paraplegia con reflexos aumentados en las piernas en la respuesta plantar extensora, con signos mínimos involucrando a la columna vertebral. Estos hallazgos, sumados a otros en distintas áreas sugieren la ocurrencia de puntos de desmielinización y remielinización a lo largo de

los nervios, tal vez inducido por un proceso como una vasculitis involucrando la vasa nervorum³⁸.

Probablemente el mecanismo de patogénesis se explique por la expresión de antígenos de Histocompatibilidad de clase I en células de la glia, inducidos por la p40tax en el sistema nervioso central, produciendo reacciones inflamatorias por la asociación de glicoproteínas virales con antígenos de histocompatibilidad mediadas por células T citotóxicas que reconocen el dueto. Normalmente, las células del sistema nervioso central no expresan antígenos de histocompatibilidad en sus membranas^{10,46,51}.

En la patogénesis de TSP/HAM, la infección por el HTLV-I parece ser un requisito. De hecho, en TSP/HAM, el porcentaje de células mononucleares de la sangre periférica policlonalmente infectadas por el DNA proviral del HTLV-I es mucho más alto que en células mononucleares de portadores sanos, como también son los títulos de anticuerpos en el suero y líquido cerebroespinal y el porcentaje de células T activadas y células similares a las leucémicas de ATLL. Productos virales de linfocitos T activados son encontrados en el líquido cerebroespinal de pacientes con TSP/HAM, por otro lado células endoteliales infectadas virus liberan también productos virales que podrían causar las lesiones patológicas en TSP/HAM directamente en el microambiente de estas células infectadas o a distancia. Otro posible papel de la p40tax en el sistema nervioso central es sugerido por el hecho que ratones transgénicos con la proteína tax del HTLV-I desarrollan neurofibromas, debido a que la p40 tax puede activar en "trans", el promotor del factor de crecimiento de las neuronas^{34,55}.

Se ha demostrado que el nivel de expresión del HTLV-I "in vivo" en pacientes con TSP/HAM es independiente de la severidad de la sintomatología clínica y de la duración de la enfermedad, así como, de que la mantención de la expresión viral "in vivo", (especialmente de genes regulatorios de tax-rex), pueda jugar un papel importante en el curso clínico lentamente progresivo de TSP-HAM. Decididamente, linfocitos T citotóxicos específicos en contra de antígenos del HTLV-I contribuyen a la patogénesis de enfermedades neurológicas asociadas al HTLV-I⁵⁴.

Hay muchas controversias con respecto al origen de HTLVs y HIVs como también a qué grupos raciales o étnicos son más susceptibles a la infección de estos

retrovirus. Gallo²⁶ propone que los retrovirus humanos se hayan originado en Africa y hayan sido llevados a las Islas de Japón por los navegantes portugueses. También lanza la hipótesis que durante el tráfico de negros de Africa al continente americano como esclavos, se haya introducido el virus. Trabajos en Europa, U.S. y Sudamérica, siempre mencionan que los pacientes de ATLL o neuromielopatías son de raza negra o japoneses o descendientes^{34,35}. Sin embargo, Yoshida et al.,¹² detectaron anticuerpos anti-HTLV-I en Filipinas, entre aborígenes que vivieron muchos siglos aislados, remontando su origen hace 15.000-20.000 años atrás. En las Islas del Pacífico Sur se detectó una elevada endemicidad para el HTLV-I entre aborígenes y también, entre nativos indígenas de la región Amazónica.^{8,56}

En la búsqueda del HTLV-I como patógeno responsable de otras enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple/artritis reumatoide,^{57,58,59} psoriasis,⁶⁰ lúpus eritematoso sistémico,⁶¹ síndrome de Guillain-Barré⁶² y etc..., existe controversia entre los diferentes reportes^{63,64,65}; unos mencionan la detección de anticuerpos para el HTLV-I en pacientes con enfermedades autoinmunes^{60,61,62}, otros no han conseguido detectar el DNA proviral del HTLV-I por técnicas muy sensibles como el PCR.^{66,67,68} Otros han observado por microscopía electrónica, partículas virales que se asemejaban morfológicamente al HTLV-I, sin duda, partículas del tipo C.^{69,70} Perron et al.⁶⁷ y Haar et al.⁶⁸ describen la presencia de retrovirus en cultivo de células mononucleares de la sangre de pacientes con esclerosis múltiple, que por las características de morfogénesis parece no ser un retrovirus del tipo C. Sin embargo, Reddy et al.⁶⁸ reportan la detección de segmentos génicos del HTLV-I en linfocitos de pacientes con esclerosis múltiple asociado a la presencia de anticuerpos para el virus. Parece claro que otros retrovirus, además del HTLV-I participan en la etiología de procesos autoinmunes, particularmente del sistema nervioso central^{69,70}. En concreto, la asociación etiológica del HTLV-I con enfermedades autoinmunes ha sido confirmada únicamente en las neuromielopatías, TSP/HAM, en las cuales se han detectado viriones del HTLV-I en el líquido cerebroespinal, anticuerpos específicos contra el HTLV-I producidos intratecalmente, el DNA proviral del HTLV-I en las células de la glia, además de evidencias epidemiológicas y clínicas.^{46,53,54}

Las moléculas codificadas por los genes del HLA, clasificadas en antígenos de histocompatibilidad de clase I y II, juegan un papel determinante en la susceptibilidad y desarrollo de las enfermedades autoinmunes. El reconocimiento, la especificidad y asociación de los antígenos de clase I o II con péptidos o glicoproteínas del patógeno determinan que tipo de respuesta va a desarrollar el sistema inmune, activando linfocitos T cooperadores o citotóxicos y los mecanismos disparados por estas células, al fin todo el proceso inflamatorio que pueda resultar de esta interacción.^{71,72}

Autores como, Usuku *et al.*,⁷³ investigaron el papel del HLA-DRB1 en individuos portadores del HTLV-I y enfermos padeciendo del HAM. Observaron que la frecuencia de este gen, DRB1, es similar en los dos grupos de individuos, pero detectaron una variación en el producto de este gen, en la región hipervariable de la cadena β del péptido que estaría mas frecuente en pacientes con HAM y que podría tener un papel decisivo en el curso de la enfermedad y no, en la infección por el HTLV-I.

Uno *et al.*,⁷⁴ estudiando pacientes neoplásicos, HTLV-I seropositivos y portadores sanos, observaron que, el HLA-Bw62 estaba significativamente más elevado en Leucemias Agudas de células T, y el HLA-DQw3 más elevado en pacientes con Linfoma Maligno de células T y portadores sanos. En linfocitos periféricos de pacientes con Leucemia de Linfocitos T de adultos, se detectó la expresión alterada, disminuída o aumentada, de antígenos de histocompatibilidad de clase I. Cuando se analizaron 21 familias, en que más de 2 miembros eran seropositivos al HTLV-I y 44 parejas en que uno o ambos cónyuges eran seropositivos al virus, no pudieron asociar el complejo HLA de clase I con la susceptibilidad a la infección por el HTLV-I. Los datos obtenidos indican que antígenos de clase I del HLA podrían ejercer influencia en el curso clínico de la Leucemia de Linfocitos T de adultos. Plaeger-Marshal *et al.*⁷⁵ no consiguieron inducir la expresión alterada de antígenos de histocompatibilidad de clase II por la transformación celular por el HTLV-I.

Análisis citogenéticos de las células infectadas han demostrado alteraciones con un patrón típico de lesión por el HTLV-I.^{76,77}

Maruyama *et al.*⁷⁷ reportaron hipoploidía y alteraciones estructurales al realizar análisis cromosómicos por bandas G, en 30 % de los cultivos de linfocitos infectados

con el HTLV-I propagados en menos de 200 días. En 100 % de los linfocitos examinados observaron que las alteraciones cromosómicas eran clonales. El análisis por "Southern Blot" de una línea de células T y tres líneas de células B infectadas con el HTLV-I y EBV (obtenidos de pacientes), revelaron rearrreglos del gen de la cadena Jk de las inmunoglobulinas secretoras en todas las líneas de células B y rearrreglos del gen codificando la cadena β del receptor de células T fueron observados en todas las líneas celulares independientemente de su fenotipo. Estos resultados sugieren que los linfocitos humanos sufren rearrreglos cromosómicos afectando sus genes, probablemente a través de un proceso mitótico anormal desencadenado por la integración del DNA proviral del HTLV-I, llevando a clonas bien adaptadas al desarrollo. Este proceso debe ser promovido sinérgicamente por determinados compuestos carcinogénicos presentes en el microambiente de las células infectadas por el HTLV-I.

Croce⁷⁸ en una revisión reporta que las leucemias/linfomas en la región endémica al HTLV-I en Japón, tienen el mismo tipo de translocaciones e inversiones cromosómicas que suelen ocurrir en Leucemias/Linfomas de Linfocitos T en Europa y América en ausencia del HTLV-I y propone que el HTLV-I esta sólo aumentando la proliferación de células T que acarrean los genes de los receptores de linfocitos T en rearrreglo y por lo tanto aumenta la probabilidad de una translocación cromosómica y una consecuente neoplasia de células T.

Estudios epidemiológicos han detectado altos niveles de infección por el HTLV-I en áreas en que las poblaciones son homogéneas, como en Japón y Africa, y descendientes en el Caribe y demás áreas del planeta.^{3,6,5} Además, la detección de elevada seroprevalencia para el HTLV-I entre aborígenes de diferentes localidades^{7,8,12}, sugiere fuertemente la diseminación del virus en núcleos humanos étnicamente homogéneos, tal vez determinada por las características de transmisión del virus, en núcleos familiares.^{48,49}

5. Material y Métodos.

5.1. Fundamentos y descripción de las metodologías empleadas.

5.1.1. Colecta de muestras de sangre.

Fueron tomadas muestras de sangre periférica, por punción venosa, de individuos de diferentes poblaciones de la Amazonia brasileña (Figura 1), viviendo en zonas rurales y urbanas, incluyendo amerindios, inmigrantes japoneses y sus descendientes y mestizos, involucrando individuos sanos como profesionales de salud, donadores de sangre, grupo control y pacientes con diferentes tipos de neoplasias y otras enfermedades (neuropatías, genopatías, malaria y HIV seropositivos); además se colectaron muestras de sangre de diferentes especies de simios amazónicos e importados de Africa (Tabla 1-2-3).

5.1.2. Pruebas serológicas empleadas para la detección de anticuerpos anti-HTLV-I/II.

Las pruebas serológicas utilizadas en este trabajo de investigación fueron la Aglutinación Pasiva con partículas de Gelatina (PA) y Ensayos Inmunoenzimáticos, ELISA y ElectroInmunoTransferencia (Western Blot).

Las muestras de sangre total fueron procesadas para la obtención de anticuerpos anti-HTLV-I/II de especímenes de suero o plasma, almacenados a - 20 °C hasta su utilización (Figura 2).

5.1.2.1. Método de Aglutinación Pasiva con Partículas de Gelatina (PA).

El método de PA⁷⁹ se basa en la sensibilización de partículas de gelatina (esferas sintéticas de 3 µm de diámetro compuestas de gelatina y goma arábiga) con antígeno viral obtenido del cultivo de células TCL-Kan (individuo portador sano de HTLV-I) a través de doble centrifugación en gradiente de sucrose a 0-55 % y posteriormente a 20-65 % a 3,000 rpm por 18 horas. Las partículas virales obtenidas en la fracción con densidad de

1.16 g/cm³ fueron solubilizadas con 0.5 % Nonidet p40. La solución de proteína viral, a una concentración de 10 µg/ml fue mezclada con igual volume de suspensión de partículas de gelatina a una concentración de 2X10⁹ partículas por mililitro. La solución resultante fue incubada por 1 hora a 37°C y posteriormente lavada con solución reguladora de salina fosfatada.

Las partículas de gelatina sensibilizadas con el antígeno viral fueron resuspendidas en solución reguladora de salina fosfatada, pH 7.4 y liofilizadas. A partir del liofilizado, se preparó una suspensión a 1 % con 1 µg de proteína/5X10⁴ partículas por mililitro, que se utilizó en la prueba serológica. En el ensayo serológico, alícuotas de 25 µl de la suspensión de partículas sin antígeno viral y con antígeno viral fue mezclada con igual volume de suero/plasma diluido en series, 1:8 y 1:16 respectivamente, en pocitos en forma de U, de una placa de microtitulación con 96 pocitos.

El control positivo se constituye de suero hiperinmune de conejo anti-HTLV-I.

La mezcla se incubó por 2 horas a la temperatura ambiente. Los patrones de reacción positiva y negativa son observados a simple vista, con aglutinación y sedimentación de las partículas de gelatina con el suero/plasma respectivamente (Figura 3).

5.1.2.2. Método de ELISA.

El ensayo inmunoenzimático de ELISA⁸⁰ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) se fundamenta en la detección del complejo antígeno-anticuerpo a través de un conjugado, enzima con una anti-IgG dirigida al anticuerpo del complejo inmune, que se revela bajo la adición y desdoblamiento de un sustrato, resultando en productos coloridos.

A partir del cultivo de linfocitos infectados con el HTLV-I de un paciente japonés con ATLL, se obtuvo antígeno viral, el cual fue utilizado para sensibilizar los pocitos de una microplaca de polistireno de 96 pocitos en fondo plano. La sensibilización de la microplaca ocurre por interacción electrostática de la superficie de los pocitos con las moléculas del antígeno viral. Los pocitos sensibilizados son lavados con solución reguladora de salina fosfatada con el objeto de remover el exceso de antígeno. Los sitios libres son bloqueados con la adición de seroalbumina bovina a 1 % en solución reguladora de salina fosfatada. Después del lavado, las muestras de suero/plasma son adicionadas a los pocitos a

una dilución de 1:21, seguido de incubación a 37 °C por 1 hora, para permitir la interacción del antígeno con el anticuerpo. Terminada la incubación, la placa es lavada y es adicionado el conjugado, “anti-IgG humana con fosfatasa alcalina”, seguida por otra incubación a 37 °C por 1 hora, condiciones necesarias para la interacción del conjugado con el anticuerpo del complejo antígeno-anticuerpo. En seguida, se adiciona el sustrato, p-nitrofenilfosfato y se incuba por 30 minutos. Con el objeto de inhibir mayor desdoblamiento del sustrato por la luz, se adiciona a la reacción hidróxido de sodio (NaOH) a 3 N. Durante todo el proceso, controles positivos, negativos y blanco son sometidos a todos los pasos de la prueba. En el control positivo se utiliza suero humano con anticuerpos anti-HTLV-I y en el control negativo, suero humano comprobadamente negativo en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I. En el blanco se adiciona solución reguladora salina fosfatada en lugar del suero.

La intensidad de la coloración producida por el desdoblamiento del sustrato es cuantitativamente determinada en un lector de ELISA, espectrofotómetro, con un filtro de 405 nm. La absorbancia se expresa en densidad óptica (D.O), que en el control positivo, con un mínimo de 4 repeticiones debe estar en el rango de 0.800 a 2.100 O.D., mientras que el control negativo, en número de 2 repeticiones, debe de leerse en el rango de 0.0 a 0.200 O.D.. A la lectura de la absorbancia de todas las muestras y controles, se sustrae el valor del blanco.

Las muestras reactivas, deben presentar valores de D.O. arriba del punto de corte, el cual se calcula, dividiendo la media aritmética de los controles positivos entre 4. El valor de punto de corte es la línea de división entre valores reactivos y no reactivos (Figura 4).

5.1.2.3. Método de ElectroInmunoTransferencia (Western Blot, WB).

En la metodología de Western Blot³⁵, antígenos virales obtenidos del sobrenadante de cultivo de linfocitos infectados con el HTLV-I, son adicionados a carriles de gel de poliacrilamida a 12 % con dodecilsulfato de sodio y separados los péptidos electroforéticamente. Después de visualizadas las bandas bajo tinción con nitrato de plata y desteñidas, se somete los péptidos a electrotransferencia a filtro de nitrocelulosa.

Concomitantemente, marcadores de peso molecular sufren el mismo proceso de electroforesis en el gel para determinar el peso molecular de los péptidos separados y transferidos. La eficiencia de la transferencia es hecha con tinción con "aurodye", la cual reveló bandas de péptidos virales con pesos moleculares de 19 Kd, 24 Kd, 29 Kd, 34 Kd, 36 Kd, 42 Kd, 53/55 Kd, y glicopéptidos de 46 Kd y 61/68 Kd. Después de desteñida la hoja de nitrocelulosa, se corta en tiras y los sitios libres son bloqueados por la inmersión en Tris-HCl 0.15 M, Tween 0.2 % y leche a 5 % durante 30 minutos. Posteriormente las tiras son lavadas en solución reguladora salina fosfatada y adicionado suero/plasma a una dilución a 1:50 en salina fosfatada. Se incuba por 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación para permitir mejor interacción del antígeno con el anticuerpo. Terminada la incubación, las tiras son lavadas para remoción del exceso de anticuerpos y se adiciona el conjugado, de suero hiperimmune de cabra anti-IgG humana con fosfatasa alcalina; se incuba por 1 hora a la temperatura ambiente, bajo agitación. En seguida, se adiciona el sustrato, NBT-BCIP (azul de nitrotetrazolio, 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato). El desarrollo de bandas teñidas en azul revela la presencia de anticuerpos en contra de péptidos del HTLV-I (Figura 5). Son consideradas positivas las muestras que presentan por lo menos una banda para un péptido codificado por la región GAG (p19 y/o p24) y un glicopéptido de la envoltura viral (gp46 y/o gp61/68), según los criterios del Servicio de Salud Pública de los E.U.⁸¹.

5.1.3. Análisis de Acido Nucleico retroviral.

Las pruebas moleculares utilizadas en esta tesis fueron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación "Southern Blot", que con el empleo del gel "hydrolink D600", permitió el análisis de polimorfismo conformacional de cadenas simple de DNA (SSCP).

5.1.3.1. Extracción de fragmentos de DNA del suero/plasma.

Para la ejecución de la amplificación enzimática del ácido nucleico, se procedió inicialmente a la extracción de DNA⁸² a partir de 100µl de suero o plasma de los

individuos HTLV seropositivos involucrados en el estudio. Básicamente, la técnica de extracción de fragmentos de DNA del suero/plasma difiere de la técnica de extracción de DNA de células, por la utilización de esferas moleculares de glucógeno que hacen el papel de acarreadores de los ácidos nucleicos purificados. En la extracción o purificación, se utiliza un agente caotrópico, yoduro de sodio, y sarcosinato de N-lauril sodio, para la solubilización de las proteínas contaminantes. Los fragmentos de DNA presos en glucógeno son precipitados con la adición de isopropanol y secados bajo el vacío. El protocolo estándar de esta técnica sigue los siguientes pasos; se adiciona 100 µl de suero/plasma a 300 µl de solución de extracción, se mezcla e incuba a 60°C por 15 minutos. Posteriormente se agrega igual volumen de isopropanol a la mezcla, se agita vigorosamente y se deja en reposo por 15 minutos. Se sigue una centrifugación a 10,000 g X 5 minutos para precipitar el DNA. Se adiciona 1 ml de isopropanol a 40% y se homogeniza en vórtex, para entonces sedimentar el DNA bajo centrifugación a 10,000 g X 5 minutos y se seca al vacío.

5.1.3.2. Amplificación enzimática de fragmentos de DNA.

En la amplificación de los fragmentos de DNA, se seleccionó “primers” para las regiones génicas del LTR y GAG del HTLV-I y TAX común al HTLV-I y II, variando la longitud entre 19 a 23 bases nucleotídicas (Tabla 4).

La región LTR^{26,41,42} es la más conservada entre los prototipos del HTLV-I, en los sitios que regulan la transcripción, procesamiento y poliadenilación del RNA, mientras que otros fragmentos no codificantes y teóricamente no funcionales, son las regiones más variables de todo el genoma viral. En la selección de los “primers” y de la sonda para la región LTR, se buscó las regiones más conservadas entre los prototipos del HTLV-I, que corresponde a la posición 582 a 603 de 5' a 3' y 744 a 764 de 3' a 5'. La sonda, en antisentido, no abarca regiones del “primer” y se dirige al core de la región predecible a ser amplificada, en la posición 624 a 655.

La región GAG^{26,41,42} del HTLV-I comparte secuencias con otros retrovirus relacionados como el HTLV-II y HRES-1, aunque sea una región muy conservada, la variación génica en esta área dió paso a la evolución de retrovirus relacionados. Las

secuencias seleccionadas del "primer" fueron exclusivas para la amplificación del HTLV-I, consistiendo de una secuencia que empieza en la posición 824 y termina en 842, en el sentido de 5' a 3', y de la posición 1017 a 1039 de 3' a 5'. La sonda antisentido abarca desde la posición 931 a 960 sin extenderse en la región del "primer".

Por su función, el gen TAX^{35,38,45} es el que presenta mayor grado de conservación, particularmente en el sitio responsable para la activación en "trans" de secuencias correlacionadas. La secuencia nucleotídica seleccionada para el "primer" del TAX es común al HTLV-I y II, involucrando las posiciones de 7358 a 7377 de 5' a 3' en el HTLV-I y 7248 a 7267 de 5' a 3' para el HTLV-II y la secuencia de 7496 a 7516 en el HTLV-I y 7386 a 7406 en el HTLV-II de 3' a 5'. La sonda antisentido no abarca la secuencia del "primer" y se extiende de 7447 a 7486 en el HTLV-I y 7337 a 7376 en el HTLV-II.

Una mezcla denominada cóctel (volumen total de 100 µl), compuesta de oligonucleótidos (100 µM), dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos) de Adenina, Guanina, Citosina y Timina (dATPs, dGTPs, dCTPs, dTTPs), DNA polimerasa (pfu) (2.5 U), "primers" (0.5 µM), 10 µl de solución reguladora y sales fue adicionada a la muestra de DNA (5 µl)*. El proceso inicial de la reacción involucró la desnaturalización del DNA a 94 °C por 7 minutos. Después de adicionado el cóctel, sedimentado los reactivos y sellada la solución con aceite mineral, se llevó la mezcla a desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, seguido de una reducción en la temperatura a 55 °C por 2 minutos para que se procesara el apareamiento del "primer" a la secuencia blanco, la síntesis/extensión de la cadena nucleotídica ocurrió a 72 °C por 3 minutos. Esta etapa se repitió 20 veces, con excepción de la primera desnaturalización.

Se hizo la extracción orgánica de los fragmentos de DNA (diluido a 1:500) y se procedió a una segunda etapa de PCR con el fin de aumentar el número de copias. Después de la desnaturalización a 94 °C por 7 minutos, se volvió a adicionar el cóctel y se prosiguió a las etapas de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, apareamiento a 55 °C por 60 segundos y síntesis/extensión a 72 °C por 30 segundos. Estos ciclos se repitieron por 10 veces (Figura 6).

*Se estima que 5 µl de suero/plasma contenga cerca de 100 ng de ácido nucleico.

Todas las etapas del PCR ^{44,83} fueron llevadas a efecto en el "Quick Thermo System" (Nippon Genetics Co, Ltd., Tokyo, Japan) automatizado, observándose rigurosamente el cuidado para evitar contaminación con nucleótidos exógenos y entre el DNA de las propias muestras.

Los controles del PCR constaron de una muestra de DNA extraído del cultivo de células Lma-66 de un paciente japonés, infectado con HTLV-I, y el control negativo contenía todos los reactivos con excepción del DNA.

A fin de extraerse el producto final de la amplificación enzimática, se sometieron las muestras procesadas a precipitación con etanol/cloruro de litio (LiCl, 4 M) seguida de remoción de proteínas (polimerasa, pfu) con cloroformo y deshidratación en una serie creciente de grado de etanol y evaporación con acetona.

En la corrida electroforética para la separación de los fragmentos amplificados, se utilizó el gel "Hydrolink D600" a 5 %, el cual posee la propiedad de resolver bandas con mutaciones puntuales cuando es realizado en condiciones alcalinas (Tris-Borato EDTA) Las mutaciones puntuales, por el cambio de bases nucleotídicas, ocasiona cambios en la conformación de la molécula, alterando la migración en el gel. Los fragmentos separados fueron electrotransferidos en membranas de "Byodine B 0.45 µm", la cual fija fuertemente los oligonucleótidos y conserva sus patrones de migración sumado al hecho de ser altamente resistente a tensiones propias de la manipulación. Este sistema de electroforesis bajo las condiciones antes mencionadas resuelve óptimamente fragmentos en el rango de 80 a 600 bases de nucleótidos ^{44,83,84}.

En la ejecución de la electroforesis, las muestras fueron resuspendidas en Tris-Borato-EDTA/azul de bromofenol/formamida/ xileno cianol y depositadas (85 µl) en los carriles del gel "Hydrolink D600" a 5 % bajo condiciones alcalinas. La corrida electroforética fue llevada a cabo en una cámara vertical "Tefco" bajo circulación de la solución de corrida (Tris Borato-EDTA/ Bromuro de etidio) a temperatura media de 20 °C, 100 V por 90 minutos. La visualización de las bandas de oligonucleótidos se hizo en un transiluminador "Cronex", "Quanta II", con ultravioleta de ondas cortas ^{52,44,83}.

El gel "Hydrolink" conteniendo las bandas de polinucleótidos resultantes de la amplificación fue fijado a una membrana de nylon (byodine) en una cámara vertical "Tefco"

a 100 V por toda la noche en baño de solución circulante (Tris Borato sin EDTA) entre 8 a 10 °C. Terminada la transferencia, los polinucleótidos fueron fijados a la membrana de "byodine" bajo exposición a la luz ultra-violeta por 30 segundos (120.000 microjoules) "Stratalinker" (Stratagene Cloning System, Ca, U.S.A.)^{44,83,84}.

Con el objetivo de confirmarse la amplificación correcta de los segmentos deseados, se llevó a cabo la hibridación utilizando sondas sintetizadas a partir de las regiones previstas a ser amplificadas de acuerdo a los "primers" seleccionados (Tabla 5).

Previamente a la hibridación propiamente dicha, las muestras fueron pre-hibridadas utilizándose DNA de esperma de salmón en solución de pré-hibridación, selladas en botellas e incubadas por 5 horas a 65 °C en un horno rotatorio^{44,83,84}.

Los oligonucleótidos utilizados para la síntesis de las sondas fueron modificados enzimáticamente por la adición de nucleótidos acoplados a digoxigenina (Boehringer Mannheim, Biochemica) a través de la transferasa terminal (Molecular biology, Boehringer Mannheim) en el 3'OH de la cadena de DNA*.

La hibridación fue llevada a cabo después de quitarse totalmente la solución de pre-hibridación. Las hojas de "byodine" fueron inmersas en solución de hibridación conteniendo la sonda e incubadas durante toda la noche a 65 °C en horno rotatorio.

Después de lavadas las hojas de "byodine" en solución reguladora de maleato, bajo vigorosa agitación, cambiándose 2 veces la solución, fueron transferidas a una bolsa de plástico conteniendo el conjugado de anti-digoxigenina (IgG/Fab) con fosfatasa alcalina. El sustrato, quimioluminescente, CSPD ($C_{18}H_{20}ClO_7PNa_2$), fue adicionado después de 2 horas a la temperatura ambiente. La detección de las bandas se hizo con la aplicación directa de las hojas de "byodine" a una placa fotográfica X omat/GBX-2 (Kodak Diagnostic Film, Tokyo, Japan). La emisión de luz ocurre con el desdoblamiento del CSPD bajo la acción de la fosfatasa alcalina^{44,82,83}.

*Sondas donadas gentilmente por Dr.Koshi Maruyama.

5.1.4. Análisis Estadístico.

Los programas utilizados del Paquete Estadístico de Ciencias Sociales de Nie *et al.*⁸⁵ fueron Frecuencias, Correlación y Análisis discriminante de Mahalanobis.

Las variables empleadas fueron sexo, edad, origen, historia de transfusión de sangre, diagnóstico o categoría, exposición a la radiactividad o no, seroreactividad por PA, valor de absorbancia en seroreacción por ELISA, seroreactividad para péptidos virales por WB y amplificación/hibridación de secuencias génicas del HTLV-I.

La historia de transfusión de sangre se evaluó en sí o no, de acuerdo a la ocurrencia o no de transfusión de sangre, sin llevarse en cuenta el número de veces, cuando se trató de caso afirmativo.

El grupo control se constituye de individuos sanos de diferentes localidades de la región Amazónica, no involucrados en ninguno de los grupos ya mencionados (profesionales de salud, donadores de sangre, individuos enfermos, amerindios y japoneses).

A los individuos sin ninguna patología* (profesionales de salud, amerindios, inmigrantes japoneses y sus descendientes, individuos del grupo control y familiares de individuos HTLV-I seropositivos) se convenció denominarlos grupo normal, en oposición al grupo de enfermos (neoplásias, neuropatías, genopatías y pacientes de ginecología). Tomando en cuenta el riesgo a la exposición a patógenos transmitidos por las vías descritas para los retrovirus, se dividió a las poblaciones* en: de alto riesgo (pacientes neoplásicos, profesionales de salud, inmigrantes japoneses y sus descendientes, pacientes con neuropatías y pacientes con genopatías) y de bajo riesgo (individuos del grupo control y amerindios amazónicos).

En cuanto a la exposición a la radiactividad, los individuos fueron clasificados en, pacientes neoplásicos que fueron sometidos a la radioterapia, personal técnico radioterapista y personal del hospital que cuida de los pacientes sometidos a la radioterapia.

En la seroreactividad a PA, los individuos fueron clasificados en seroreactores o no.

*Individuos HIV seropositivos, pacientes con malaria y donadores de sangre no fueron incluidos en estas categorías por haber sido sometidos solamente a ELISA.

6. Resultados.

6.1. Análisis de Población.

Entre las variables, la que presentó mayor dispersión fue la edad. Fueron colectadas muestras de infantes de 1 año de edad a personas de tercera edad, con el máximo de 86 años. Niños con menos de 13 años representan 12.25 % (345/2,815) de la muestra; individuos entre 13 a 27 años representan 23.44 % (660/2,815); individuos entre 28 a 50 años abarcan 40.92 % (1,152/2,815), y lo restante, 23.37 % (658/2,815) corresponde a individuos con más de 50 años de edad (Figura 7).

El número de individuos del sexo femenino y masculino son equivalentes, 50.02 % (1,408/2,815) del sexo femenino y 49.98 % (1,407/2,815) del sexo masculino (Figura 8). Hubo considerable predominancia del sexo femenino entre profesionales de salud y pacientes neoplásicos y obviamente, sólo mujeres en el grupo de pacientes ginecológicos (Tabla 1).

Sóloamente 8.70 % (245/2,815) de todos los individuos involucrados en el estudio reportaron haber sufrido transfusión de sangre, sin embargo, 33.58 % (131/390) de los pacientes neoplásicos habían sido transfundidos (Figura 9).

La exposición a la radiactividad, directa o indirectamente, por la cobaltoterapia, fue evaluada únicamente entre profesionales de salud y pacientes oncológicos del hospital de cáncer Ofir Loyola, Belém, Pará, Brasil. Cerca de 58.57 % (328/560) de estos 2 grupos fueron expuestos a la radiación, sea como pacientes oncológicos, radioterapistas, o como personal de enfermería en contacto directo con los pacientes irradiados (Figura 10).

6.2. Análisis Serológico.

En dos grupos se dividieron las muestras; uno con 2,131 muestras, que fue sometido a PA, ELISA, WB y PCR/hibridación y el otro, con 684 muestras, las cuales fueron únicamente probadas por ELISA. En el grupo con 2,131 muestras, 50 (2.34 %) reaccionaron por PA; estas cuando fueron analizadas por ELISA generaron 34 muestras (1.59 %) con D.O. mayor que el punto de corte (0.381), las cuales al ser sometidas al WB, 12 muestras (0.56 %) desarrollaron bandas para péptidos del GAG y glicopéptidos del ENV

HTLV-I/II simultáneamente, mientras que 6 reaccionaron únicamente en contra de péptidos del GAG (WB indeterminados) (Tabla 6, Figura 11). El otro grupo, con 684 muestras, al ser sometido al ELISA, 19 (2.77 %) presentaron valores de D.O. superior a 0.920, por lo tanto superior al punto de corte (0.381). De estos, sólomente 2 muestras alcanzaron valores de D.O. superior a 2.00.

En el otro grupo de 158 simios de Amazonia y Africa, sólomente 6 simios africanos presentaron D.O. superior al punto de corte (3.79 %), 2 de estos con D.O > 2.00, mientras que ningún simio amazónico presentó seroreactividad al HTLV-I/II (STLV-I).

6.3. Análisis Molecular.

Las 7 muestras seleccionadas y sometidas al PCR hibridaron con la sonda para el HTLV-I/II TAX y HTLV-I GAG; 6 muestras hibridaron con la sonda para el HTLV-I LTR (6 muestras hibridaron con las 3 sondas) (Figura 12-13-14).

Además de la detección de las regiones génicas del GAG y LTR del HTLV-I y TAX del HTLV-I y -II, la utilización del gel "hydrolink D600" permitió la observación de polimorfismo conformacional de cadena simples de DNA, por la migración de los fragmentos amplificados y hibridados en diferentes posiciones en el carril del gel con referencia al control positivo.

La región GAG fue la que presentó mayor grado de polimorfismo conformacional en las muestras amplificadas/hibridadas, mientras que en la región LTR, una sólo muestra presentó diversas bandas dispersas en el carril (Figura 12-13-14)

6.4. Análisis Estadístico.

Los 12 individuos comprobadamente seropositivos para el HTLV-I/II por los métodos de PA, ELISA y WB, generaron una tasa total de seroprevalencia de 0.56 % (12/2,131); de 1.76 % (3/170) entre profesionales de salud; de 1.02 % (4/390) entre pacientes neoplásicos; 14.28 % (2/14) entre familiares de HTLV-I/II seropositivos (hubo un individuo seropositivo a HTLV-I clasificado como profesional de salud y familiar de individuo HTLV-I seropositivo); 0.38 % (3/770) entre el grupo control y 0.20 % (1/487) entre amerindios amazónicos (Figura 15-16-17-18-19-20). Los datos de seroprevalencia a

HTLV-I entre las diferentes categorías de grupos humanos probados son significativamente distintos, de acuerdo al análisis por la χ^2 , $p=0.01$.

Individuos subagrupados en la categoría de normal presentaron 0.52 % (8/1,540) de seroprevalencia a HTLV-I (Figura 21). Este grupo representa 66.66 % (8/12) de todos los seropositivos detectados. Los individuos enfermos representan 33.34 % (4/12) de los individuos HTLV-I seropositivos, todos clasificados como pacientes con neoplasia cervicouterina.

Entre los individuos WB indeterminados, según los criterios del USPHS⁸¹, se encontraron 2 individuos del grupo control (de la isla de Marajó), 2 pacientes con neoplasia cervicouterina, 1 paciente con Leucemia Linfocítica Aguda y 1 paciente con neoplasia de piel (Figura 11)

Los pacientes de ginecología, individuos con neuropatías, genopatías y los japoneses y sus descendientes, todos resultaron seronegativos al HTLV-I/II.

Comparándose la incidencia del HTLV-I entre los grupos probados, los pacientes con cáncer cervicouterino, los profesionales de salud y los familiares de individuos HTLV-I seropositivos presentaron 2.68, 4.63 y 35.57 veces mayor frecuencia de seropositividad respectivamente que el grupo control, mientras que los amerindios Waiãpi presentaron 0.52 veces menor frecuencia que el grupo control (Tabla 7).

Entre los individuos del grupo de alto riesgo a la infección al HTLV-I (profesionales de salud, inmigrantes japoneses y sus descendientes, pacientes con neoplasia, individuos con neuropatías, genopatías y familiares de individuos HTLV-I/II seropositivos) representando 41.01 % de la población total, se detectó una seroprevalencia de 0.37 % (8/2,131), mientras que la seroprevalencia entre los individuos de bajo riesgo (individuos del grupo control y amerindios amazónicos) fue de 0.18 % (4/2,131) (Tabla 8).

La edad media general de los individuos HTLV-I seropositivos es alrededor de 39.1 años, siendo más baja entre seropositivos normales (Profesional de salud, Grupo control, Amerindio Waiãpi, Familiar de individuo HTLV-I seropositivo) 36.4 años y más alta entre pacientes oncológicos, 49.8 años (Tabla 9).

Quatro de los 12 (33.33 %) individuos HTLV-I seropositivos reportaron haber sido transfundidos con sangre y los 66.66 % restantes, declararon no haber sido sometidos a transfusión de sangre (Figura 22).

Todos los individuos seropositivos hallados se concentraron en el Noreste de la Amazonia brasileña en las ciudades de Belém y Santa Cruz do Arari, en el estado de Pará y en la tribu Waiãpi, en el estado de Amapá, en la región más septentrional de Brasil, frontera con la Guyana Francesa (Figura 1, Tabla 3).

Los grupos de donadores de sangre (Hemocentro), HIV seropositivos y Plasmodio positivos, fueron probados únicamente por el método de ELISA. Los seroreactores para el HTLV-I/II y/o STLV-I por ELISA, que presentaron valores de absorbancia mayor que 2.00 siempre se revelaron seropositivos al WB (Tabla 10-11).

En un grupo de 316 individuos HIV seropositivos, 15 muestras presentaron D.O mayor que 0.920 (4.76 %), de los cuales, 2 individuos (0.63 %) presentaron D.O mayor que 2.00 (Tabla 11).

Entre pacientes con malaria, con microscopía positiva al *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax*, 4 de 168 (2.38 %) individuos reaccionaron positivamente con D.O mayor a 0.920 (Tabla 11).

Todas las 200 muestras de donadores de sangre presentaron D.O menor que el punto de corte por ELISA, por lo tanto fueron considerados seronegativos (Tabla 11).

De los 158 primates no humanos probados, solamente 4 simios africanos, *Cercopithecus aethiops* resultaron HTLV-I/II/STLV-I seropositivos cuando fueron probados por el método de ELISA, con D.O. mayor que el punto de corte, alcanzando valores mayores que 0.920 y de estos, 2 presentaron D.O mayor que 2.00 (Tabla 11). Ninguno de los simios amazónicos (*Cebus apella*, *Cebus albifrons*, *Cebus nigritatus*, *Callicebus moloch*, *Callithrix jacchus jacchus*, *Callithrix argentata argentata*, *Aotus agarae infulatus*, *Alouatta belzebul belzebul*, *Chiropotes satanas utahicki*) sometidos a ELISA presentaron D.O arriba del punto de corte, considerados por lo tanto seronegativos.

De los 12 individuos HTLV-I/II seropositivos, 66.66 % (8/12) fueron expuestos a la radiactividad, siendo que 50 % (6/12) estuvieron recibiendo una carga mayor por el hecho

de ser radioterapeutas y pacientes oncológicos bajo cobaltoterapia (Figura 23). El coeficiente de correlación entre la exposición a la radioactividad y el desarrollo serológico de bandas de péptidos/glicopéptidos por el WB es bajo, siendo el valor mínimo de $r=-0.1063$ al valor máximo de $r=0.2920$, $p=0.001$.

El coeficiente de correlación entre los métodos de PA y ELISA es de 0.7672 , $p=0.001$, demostrando que hay mínima distinción en la eficiencia de estas técnicas serológicas.

Analizándose el coeficiente de correlación entre los péptidos y glicopéptidos del HTLV-I con seroreactividad en el WB, se obtuvo los siguientes datos: la p29 y p36 siempre se expresan conjuntamente, $r=1.00$. Presentan alto grado de asociación la p42, la p34 y p36, $r=0.9091$; la p42 y gp46, $r=0.8740$; los glicopéptidos virales de la envoltura, gp46 y gp61/68, $r=0.8593$ y los péptidos más comunes del GAG, la p24 y p19, $r=0.8345$. El grado de asociación entre la p42 y p24 es elevado, $r=0.7833$. La p53/55 suele ocurrir en débil asociación con la p24, p42 (0.3038) y gp 46 (0.2091), $r=0.3364$, disociándose de los demás péptidos. En todos los casos la probabilidad de error fue de $p=0.001$ (Tabla 12).

El análisis del coeficiente de correlación entre las secuencias amplificadas por los primers del LTR/HTLV-I, GAG/HTLV-I y TAX/HTLV-I/II, demostró que el LTR siempre vá asociado a TAX, $r=0.9179$, y en menor grado con el GAG, $r=0.8154$; la asociación entre GAG y TAX disminuye, $r=0.7485$, $p=0.001$ (Tabla 13).

En la tabla 14 se resume los datos de seropositividad a HTLV-I entre los grupos humanos probados, discriminándose la reacción a los distintos péptidos/glicopéptidos de HTLV-I.

7. Discusión.

En los métodos serológicos aquí empleados, los antígenos virales fueron preparados a partir de cultivos celulares infectados con HTLV-I, sin embargo no son suficientemente específicos, presentando reacción cruzada con el HTLV-II. Para la determinación del tipo de virus, HTLV-I o II, se empleó la técnica de PCR/hibridación.

La prueba de PA detecta falsos seropositivos como ha sido demostrado por Ando *et al.*,⁸⁶ debido a que el péptido p24 del antígeno total que recubre las partículas de gelatina, tiene punto isoeléctrico distinto de la p24 del HTLV-I. Sato *et al.*⁸⁷ también reportan seroreacción cruzada para la p19 y p28 del HTLV-I en individuos recientemente infectados por el virus de Varicella-Zoster con el método de PA.

Detectamos 50 de 2,131 (2.34 %) individuos reactivos a HTLV-I/II por PA, sin embargo, en la prueba confirmatoria de WB, solamente 12 de estos 50 (24 %) resultaron HTLV-I seropositivos, datos que coinciden con el expuesto anteriormente.

White⁸⁸ comparó el método de PA con el de ELISA, Inmunofluorescencia directa y radioinmunoensayo competitivo, y concluyó que el PA, por ser muy sensible, es el método de selección en pruebas preliminares, cuando se tiene una cantidad masiva de especímenes a ser analizada, confirmándose los seroreactivos con otras pruebas más específicas.

El método de ELISA reforzó la previa selección hecha por el PA. Cuando se analizaron por el método de WB los seropositivos a PA y ELISA y los seropositivos a PA y seronegativos a ELISA, se observó que el método de ELISA fue más específico, aunque no todos los valores de D.O mayor que el punto de corte (0.381), presentaron patrones de seropositividad por el WB, pero los valores con D.O cerca de 7 veces más alto que el punto de corte (alrededor de 2,00), presentaron patrones característicos de seropositividad para el HTLV-I/II (Tabla 10).

De un total de 34 muestras seroreactivas a ELISA (PA seropositivas) con valores de D.O, mayor que el punto de corte, 12 muestras (D.O>2.00) desarrollaron bandas simultáneamente para los péptidos del GAG y ENV y 6 muestras (con D.O < 2.00 y >0.920) presentaron bandas únicamente para péptidos del GAG. Las muestras restantes no

presentaron bandas o entonces bandas aisladas de ENV o GAG, clasificadas por lo tanto como seronegativas en el WB ($D.O < 0.920$) (Figura 11).

De acuerdo a las normas del Servicio de Salud Pública de los E.U., USPHS,⁸¹ las muestras que presentan bandas solamente para péptidos del GAG son consideradas "WB indeterminadas". No obstante, Maruyama⁸⁹ comenta que el HTLV-I producido por células Lma-66 (HTLV-I/Lma-66) en su laboratorio no expresan antígenos de envoltura y la infección a las células vecinas ocurre por contacto muy íntimo de membranas intercelulares, por lo tanto, si esto ocurre "in vivo" consecuentemente no habrá estímulo del sistema inmunológico, contra las glicoproteínas de la envoltura viral. Considerando lo anterior expuesto, las 6 muestras de la tesis, "WB indeterminadas" podrían ser seropositivas para el HTLV-I y los valores de seroprevalencia por lo tanto estarían aumentados.

Murphy *et al.*⁹⁰ reportan en su investigación seroepidemiológica realizada en Jamaica que la detección únicamente de los productos del GAG del HTLV-I es suficiente para considerar seropositivos a los individuos probados, basados en datos de correlación de serología y pruebas moleculares. Maruyama^{7,89} y Murphy⁹⁰ divergen de las normas del USPHS, en las cuales, la mayoría de los epidemiólogos se basan. Esto ha provocado polémica en cuanto a la circulación del HTLV-I entre aborígenes amazónicos y la asociación del síndrome de Guillain-Barré y otras enfermedades autoinmunes/neurológicas con el HTLV-I. Los datos reportados por nosotros en colaboración con Maruyama^{7,56}, Voltz *et al.*⁵⁷ y Radahl⁵⁹ se basan en la detección de anticuerpos para antígenos del GAG solamente, por la técnica de WB aunque otras metodologías hayan sido utilizadas como ELISA e Inmunomicroscopía electrónica (utilizándose también antígenos del GAG).

En la metodología empleada por Maruyama *et al.*^{7,56} para la detección de anticuerpos anti-HTLV-I, una selección preliminar es hecha con el método de ELISA y la confirmación, tanto por la técnica de inmunomicroscopía electrónica (anti-IgG conjugada al oro coloidal) como por WB, con péptidos del GAG de HTLV-I (p15, p19 y p24) en ambas metodologías. Todo el antígeno utilizado en las 3 técnicas proviene de Lma-66/HTLV-I. Estos resultados son criticados por varios investigadores que discuten la detección de falsos seropositivos, en vista de que las proteínas del GAG comparten epítopes con diversos agentes infecciosos y proteínas humanas,^{86,87,91} por otro lado no se puede descartar la

posibilidad de que casos de "WB indeterminados" se deban a HTLV-I/II proviral defectivo o variantes del HTLV.

El empleo del PCR/hibridación en la tesis demostró indudablemente que las 7 muestras seleccionadas de un total de 12 seropositivos, poseen el genoma del HTLV-I (Figura 12-13-14).

La ejecución del PCR se realizó basándose en el método establecido por Innis *et al.*⁸³ que nos permitieron disminuir problemas inherentes a la metodología y de esta manera realizar la extracción de DNA a partir de suero/plasma en vez de utilizar células y por otro lado optimizar las condiciones de polimerización por el empleo de polimerasa pfu, sobre la cual se reportan las siguientes ventajas frente a la Taq polimerasa: el aumento en 12 veces la fidelidad en la síntesis del DNA; actúa en temperatura óptima entre 72 a 78 °C, además de conservar 95 % de su actividad después de 1 hora de incubación a 95 °C. Otra implementación realizada fue la utilización del gel "HydroLink D 600" en la corrida electroforética, con el cual se detectan cambios mínimos en las moléculas de los polinucleótidos, como mutaciones puntuales. Sumado a esto, se hizo uso de membranas de "byodine B 0.45 µ" (membrana reforzada de nylon 66 fuertemente catiónica por la presencia de grupos de amonio cuaternario de alta densidad en la superficie de los poros) en el "southern blot", la cual realza las propiedades del gel "hydroLink" y facilita la electrotransferencia por su sensibilidad y mayor retención del ácido nucleico.

Las muestras de suero utilizadas para la extracción de los nucleótidos a ser amplificadas, sufrieron ciclos de congelación y descongelación cuando fueron utilizados en las pruebas serológicas, posibilitando la acción de enzimas que pudieran degradar el DNA contenido en las muestras. A pesar de esto todas las muestras seropositivas sometidas a PCR fueron amplificadas con patrones bien definidos.

Las 7 muestras sometidas a PCR fueron amplificadas cuando se utilizó "primers" para el HTLV-I/II TAX y "primers" para HTLV-I GAG; una sola muestra no fue amplificada al ser expuesta al "primer" del HTLV-I LTR. Esta muestra se consideró también como HTLV tipo I debido a que la amplificación con los "primers" de GAG también es específica para el tipo I; se cuestiona si en este caso de la ausencia de amplificación de una muestra con el "primer" ocurrió degradación enzimática de nucleótidos por excesiva

manipulación del suero, o el genoma proviral presenta parte de la región del LTR deletada, o justamente, la región homóloga a la sonda o las regiones “primer” fueron deletada o sufrieron mutaciones a tal grado que no fue posible su hibridación. Se descarta delección total, pues sin la región LTR, no podría haber expresión viral, consecuentemente estímulo del sistema inmunológico con producción de anticuerpos anti-HTLV-I.

La visualización de diversas bandas, en diferentes posiciones en el carril, después de ser sometidas al PCR/hibridación demuestra la detección de polimorfismo conformacional de cadenas simple de DNA (SSCP), por lo que interpretamos que ocurren variaciones genéticas mínimas dependientes principalmente del huésped, ya que en su mayoría se observa una banda a la misma posición que la banda del prototipo japonés (en el prototipo no se observa este polimorfismo debido a que fue obtenido de una línea celular).

La detección de ácido nucleico viral en 7 muestras amplificadas e hibridadas con oligonucleótidos (GAG, TAX y LTR) sintetizados en base a secuencias del prototipo japonés nos confirma que el HTLV circulante en la población estudiada es del tipo I y que el grado de homología con el prototipo es muy elevado (Figura 12, 13, 14). El mapa de restricción y secuenciación del genoma o regiones amplificadas del HTLV-I de individuos confirmadamente seropositivos al virus, detectaría las posibles variaciones en el HTLV-I que circula en la Amazonia, sin embargo las pruebas serológicas empleadas en la tesis, asociadas al análisis por PCR/hibridación y SSCP nos hacen suponer que no es significativa la variación del HTLV-I amazónico, puesto que la variante del HTLV-I aislada en el Pacífico sur (Melanésia) posee variación en las glicoproteínas de la envoltura viral a tal punto que, por el WB, la glicoproteína viral del prototipo del HTLV-I no reacciona, quedando como indeterminadas.^{8,92,93}

Banki *et al.*⁹⁴ reportan la ocurrencia de retrovirus humano endógeno, “HRES-I” (secuencias endógenas relacionadas al HTLV-I), que contrariamente a su grupo de retrovirus endógenos expresan péptidos del GAG; anticuerpos anti-HTLV-I reaccionan en contra de estos péptidos. El análisis de WB del HTLV-I y HRES-I demostró epítopes comunes relacionados a la p19, p24 y p28 del HTLV-I.

Posiblemente este hallazgo podría explicar el desacuerdo de datos referentes a anticuerpos anti-HTLV-I en distintas enfermedades autoinmunes como esclerosis

múltiple,^{57,58} esclerosis progresiva sistémica,^{59,63} lupus eritematosus sistémico⁵⁹ y síndrome de Sjögren⁶⁵ entre otras,^{70,94} puesto que suero de pacientes con estas enfermedades reaccionaron en contra de péptidos expresados por el "HRES-I".^{70,94}

Entre las 6 muestras "WB indeterminadas" de la tesis, 3 muestras presentaron bandas únicamente para la p19 y p24 (Figura 11). Posiblemente el análisis de muestras de estos individuos podría revelar la expresión de retrovirus endógenos.

Probablemente el "HRES-I", el Lma-66/HTLV-I y el prototipo del HTLV-I sean formas evolutivas del HTLV en diferentes grados de maduración en las células hospederas, a partir de un retrovirus endógeno ancestral, incapaz de expresarse. En los antígenos de la región GAG, constitutivos del core del virus, confinados a la región intracelular, se encuentran los epítopes comunes, obviamente cuando el provirus se expresa produciendo viriones, ya es mayor la interacción de la membrana de la célula hospedera con las proteínas codificadas por la región ENV del virus, además la exposición del virion al microambiente intercelular y la presión selectiva del sistema inmunológico, favorecen cambios, encontrándose por lo tanto, más expuestas las glicoproteínas de la envoltura viral a variaciones antigénicas.

Basado en lo expuesto anteriormente, cabe la pregunta de sí, los "WB indeterminados" no serían HTLV inmaduros, con expresión únicamente de antígenos del core viral (GAG), o bien, HTLV completos, pero con glicoproteínas variantes en la envoltura viral, incapaces de generar anticuerpos que reconozcan las glicoproteínas del prototipo HTLV-I utilizadas en las pruebas serológicas. En estos casos aún utilizándose el PCR/hibridación para el ENV, pudieran pasar desapercibidas en caso de que la variación genómica del ENV no fuera muy extensa.

El HTLV circulante entre amerindios amazónicos todavía resulta indefinible. Trabajando en colaboración con Maruyama^{7,56} previamente al desarrollo experimental de esta tesis, detectamos anticuerpos que reaccionaron en contra de péptidos codificados por la región GAG (p15, p19 y p24) por el método de WB, utilizando el lisado viral de Lma-66/HTLV-I. La detección serológica específica de glicoproteínas del ENV no se hizo por el método de WB, no obstante, con el empleo de la Inmunomicroscopía electrónica (con anti-IgG acoplada al oro coloidal) se pudo observar viriones

reaccionando con el suero de indios de la Amazonia. En esta tesis hubo 15 muestras de amerindios PA seroreactivas, pero cuando fueron sometidas a WB, una sólo muestra fue clasificada como seropositiva. Este único hallazgo de seropositividad al HTLV-I corresponde a un indio Waiãpi, actualmente con 14 años de edad. Según informaciones de la FUNAI-Amapá (Fundación Nacional de Asistencia al Indio del estado de Amapá), estos amerindios se han mantenido relativamente aislados de la civilización, sin embargo hay reportes de transfusión de sangre, incluso el amerindio positivo fue sometido a transfusión masiva de sangre en un episodio de malaria. Además, a pesar de que la FUNAI niegue contacto sexual de los Waiãpi con civilizados, circula muy reservadamente que esto ocurrió. Recientemente se registró un caso de leucemia linfocítica aguda fulminante, culminando con el óbito de un indio Waiãpi, tío por la línea paterna del indio HTLV-I seropositivo (no se probó la muestra del amerindio fallecido, tampoco del padre del indio HTLV-I seropositivo). Exámenes clínicos del amerindio HTLV-I seropositivo no indicaron ninguna anomalía neurológica ni hematológica.

Andrade-Serpa *et al.*⁹⁵ no detectaron anticuerpos para el HTLV-I entre indios de una tribu indígena en los límites de la Amazonia brasileña con la región noreste de Brasil, en el estado de Maranhão. Rodríguez *et al.*⁹⁶ reportan la detección de anticuerpos anti-HTLV-I entre amerindios Yanomami en la Amazonia Venezolana.

Después del hallazgo de Reeves *et al.*^{11,17} de seroprevalencia de 9.9 % para el HTLV-II entre indios Guayami de Panamá ganó fuerza la hipótesis de que, entre los aborígenes del nuevo mundo circula el HTLV-II. Por otro lado, uno de los colaboradores de Reeves, Lal *et al.*,⁹⁷ trabajando con muestras del sur del estado de Pará, Brasil, de individuos con malaria, por métodos serológicos detectó 2 seropositivos, para el HTLV-II; desconociendo la etnia de los individuos estudiados en el norte de Brasil, suponiendo que estaba trabajando con una población con gran porcentaje de sangre indígena aunque realmente, la gran mayoría trae en su formación étnica participación de europeos, africanos y aborígenes, en menor proporción.

Chen *et al.*⁹⁸ reportan que individuos comprobadamente seroreactivos, cuando fueron probados por WB con la gp52 recombinante del HTLV-II, reaccionaron con HTLV-I, demostrando que aún existe epítopes comunes entre el HTLV-I y el II en la

secuencia aminoacídica de la gp52 recombinante. Por lo tanto, las 7 muestras comprobadamente acarreadoras de la forma proviral del HTLV-I en la tesis, argumenta fuertemente en contra del reporte de Lal *et al.*⁹⁷ puesto que se basas en el WB con glicoproteína recombinante sin que se demostre el genoma del HTLV-II.

Reforzando el trabajo de Lal *et al.*,⁹⁷ Azevedo *et al.*⁹⁹ con los resultados preliminares de esta tesis (incluyendo los amerindios seropositivos a PA), investigó 1,320 amerindios y detectó 17 individuos seropositivos al HTLV-II utilizando los mismos kits comerciales empleados por Lal *et al.* Los 17 individuos supuestamente HTLV-II seropositivos son indios Kayapó, ya con un amplio contacto con civilizados, incluso con reporte de enfermedades sexualmente transmisibles entre ellos.

Muy recientemente, Black *et al.*⁹² en una investigación epidemiológica muy extensa, involucrando amerindios de Panamá, Venezuela, Chile y Brasil, confirmó la presencia del HTLV, específicamente del tipo II, por métodos serológicos y moleculares, destacándose la más alta incidencia, de 47 %, entre los indios Kayapó, de entre los cuales se incluye los mekranoiti y Xicrins, que nosotros⁵⁶ en colaboración con Maruyama habíamos previamente detectado anticuerpos supuestamente anti-HTLV-I, únicamente para los péptidos del GAG, por lo tanto "WB indeterminados" según el "USPHS".⁸¹ De este grupo de amerindios (Kubenkroke/Kayapó) seropositivos a HTLV-II, nosotros en la tesis detectamos 9 seroreactivos a PA que no confirmaron por el método de WB para HTLV-I.

Grupos que investigan sobre las rutas de evolución de los PTLVs, postulan que el ancestral común a estos retrovirus se haya originado en Asia⁴¹ y posteriormente en un pasado no muy distante, divergido el HTLV-II del HTLV-I y STLV. Se ha observado que primates no humanos del viejo continente, de Asia y Africa, acarrean en su genoma el STLV-I, indistinguible por pruebas rutinarias de serología del HTLV-I⁴⁰.

Confrontándose el paralelismo entre la alta incidencia del HTLV-I entre japoneses y del STLV-I entre simios japoneses (*Macaca menestrina*), y también entre simios africanos (*Cercopitheccus aethiops*) y entre determinadas poblaciones de Africa, se buscaron anticuerpos anti-HTLV-I entre diferentes especies de simios amazónicos, sin encontrar ningún seroreactivo (Tabla 11). Sin embargo, simios africanos, importados de

Africa, cautivos en el Centro Nacional de Primatas, Belém, Pará, Brasil, presentaron fuerte reacción cuando fueron probados por ELISA para detectar anticuerpos anti-HTLV-I, generalmente con valores de D.O >2.00 (muestras en este rango de D.O, cuando fueron sometidas al WB, presentaron bandas correspondiendo a reacción con GAG y ENV de HTLV-I y se detectaron genes del HTLV-I por PCR/hibridación). Andrade Serpa *et al.*¹⁰⁰ tampoco detectaron anticuerpos anti-HTLV-I entre simios amazónicos.

Maruyama⁸⁹ menciona que simios del viejo mundo albergan el HTLV-I, hecho ya ampliamente comprobado, mientras que simios del nuevo mundo, en contrapartida, están infectados por Herpesvirus. Se podría suponer que la expresión de Herpesvirus pudieran mantener silencioso algún posible HTLV relacionado con simios del nuevo mundo.

El origen del amerindio amazónico está vinculado a la migración de pueblos asiáticos al continente americano. La coexistencia del indio con los simios es muy estrecha en la floresta; surgi la interrogación de si el amerindio amazónico estuviera infectado con el HTLV-I/II ¿no estaría también el simio del nuevo mundo? O al inverso, ya que se menciona la posible existencia del HTLV-II entre simios del nuevo mundo^{40,41}, no obstante, los simios amazónicos resultaron seronegativos al HTLV-I y entre los amerindios, un sólo caso de positividad al HTLV-I torna indefinible la cuestión. Investigaciones epidemiológicas más extensas para HTLV-I y II son necesarias para esclarecer estas dudas.

Linhares¹⁰¹ y Kitagawa *et al.*¹⁰² en el noreste y sur de Brasil respectivamente, Tsugane *et al.*¹⁰³ en Bolivia y Blattner *et al.*⁴⁸ en Hawái demostraron la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I entre inmigrantes japoneses y sus descendientes, no obstante, en la tesis, no encontramos seropositividad en este grupo, aunque se hayan probado tanto personas jóvenes y de la tercera edad, oriundas de diferentes áreas de Japón, todos residentes en el estado de Pará, Brasil.

Si comparamos nuestros datos de seroprevalencia con otros datos reportados en Brasil, encontramos que: Andrade-Serpa *et al.*¹⁰⁰ detectaron 1 individuo HTLV-I seropositivo de una comunidad de 119 negros en la Amazonia, y 8 de 215 pacientes con distintas patologías (predominantemente hematológicas/ sur de Brasil); no detectaron anticuerpos anti-HTLV-I entre 100 donadores de sangre (sur de Brasil). El

criterio para confirmación de resultados PA/ELISA/IF positivos fueron basados en la presencia de bandas en el WB únicamente para los péptidos del GAG, p19, p24 y p53/55, por lo tanto WB indeterminados, similarmente a nuestros hallazgos de 2 de 770 individuos meztizos (del grupo control de la isla de Marajó) y 4 de 390 pacientes con neoplasias, todos WB indeterminados. El individuo de la comunidad negra de la Amazonia fue considerado HTLV-I seropositivo en base a su seroreacción por Inmunofluorescencia indirecta y ELISA. De los 8 individuos seropositivos de un total de 215 pacientes con diferentes hemoblastosis, sólomente 3 pudieron ser considerados seropositivos por presentar bandas para péptidos codificados tanto por la región GAG como ENV del HTLV-I, mientras que nosotros no tuvimos ningún individuo con hemoblastosis seropositivo a HTLV-I (0/69).

Por otro lado, Cortes *et al.*¹⁰⁴ en el sur de Brasil, analizando 1,316 individuos del grupo de riesgo de contraer SIDA (homosexual, bisexual, prostitutas y esposas de hemofílicos HIV seropositivos), 80 resultaron positivos para anticuerpos anti-HTLV-I por el método de radioinmunoprecipitación (RIP). No obstante, estos datos son dudosos, pues el reporte menciona que todas las 1,316 muestras fueron probadas por el método de RIP como prueba confirmatoria por ser muy laboriosa y de muy alto costo.

El reporte de Caterino-de-Araújo *et al.*¹⁰⁵ con datos confiables, menciona la presencia tanto de HTLV-I como de HTLV-II entre individuos del grupo de riesgo de contraer SIDA (adictos a drogas endovenosas, homosexuales y bisexuales) en el estado de São Paulo (sur de Brasil). Los resultados de serología fueron cotejados con los resultados obtenidos por PCR/hibridación. Estos datos confirman los resultados de investigaciones epidemiológicas realizadas en Europa y Norteamérica, de elevada prevalencia del HTLV-II entre individuos adictos a drogas endovenosas. En la tesis, los datos referentes a los grupos de riesgo, aún son preliminares, pues también sugieren fuertemente, diseminación en gran escala del HTLV por el uso de agujas contaminadas entre grupos promiscuos (datos no mostrados en la tesis).

Ha sido reportada seroreacción cruzada^{106,107} entre el HTLV-I/II y el *Plasmodio spp.*, incluso se discute si la seroprevalencia para el HTLV-I/II encontrada en el trabajo hecho en colaboración con Maruyama⁷, entre aborígenes amazónicos, no es

debida a una reacción cruzada con Plasmodio, por otro lado otros investigadores mencionan también probable falsa seroprevalencia para el HTLV-I en determinadas áreas de Africa y Sudeste asiático^{6,12,106} consideradas zonas malarígenas, como ocurre en toda la Amazonia.

Cuando se probaron en la tesis, 168 muestras de pacientes con malaria (*Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*) del estado de Amapá, con microscopía positiva por IF, se detectaron por ELISA cerca de 30 % de seroreactores a HTLV-I/II con valores de absorbancia (D.O) elevada, arriba del punto de corte (pero menor que 0.920), sugiriendo la presencia de epítopes comunes entre el HTLV-I y *Plasmodio spp.*, tomando en cuenta que, entre los grupos probados, solamente este de plasmodio positivo, presentó elevación general de los valores de densidad óptica por ELISA (datos no mostrados). A diferencia de este hallazgo, Lal *et al.*⁹⁷ no encontraron seroreacción cruzada con HTLV en el sur de Pará, Brasil.

Comparándose la tasa general de seroprevalencia para el HTLV-I encontrada en este trabajo en la Amazonia brasileña (0.56 %) con otras áreas del planeta, se considera relativamente baja la prevalencia del virus, ya que en áreas endémicas como en Japón, la tasa de seroprevalencia varía entre 8 a 15 % en zonas hiperendémicas³⁵ y de 0.3 a 1.2 % en áreas de menor endemicidad.^{5,10,26} En el Caribe, la seroprevalencia para el HTLV-I varía entre 2.3 % en Trinidad y Tobago a 6.1 % en Jamaica.^{5,90} No obstante, hay estudios epidemiológicos que reportan tasa de infección por el HTLV-I de hasta 37 % en Japón¹⁰⁸ y Caribe.^{90,109} En los E.U.A., la tasa general de seroprevalencia para el HTLV-I varía entre 0.025 a 0.043 % entre donadores de sangre de todo el país, sin embargo alcanza valores elevados como 9 % en poblaciones de alto riesgo^{110,111}, aunque en el Noreste de México se reporta 0 % de seroprevalencia en población de alto riesgo para SIDA.¹¹²

En otras áreas de Latinoamérica, se ha reportado seroprevalencia para el HTLV-I en pacientes con TSP, de 1 a 5 % en Colombia^{10,113} y Caribe.^{109,110,111}

En Melanesia, recientemente se aisló una variante antigénica del HTLV-I, encontrándose alta seroprevalencia de hasta 15 % entre los aborígenes del área.^{41,93,108}

La seropositividad para el HTLV-I determinada en la tesis se concentra en 3 grupos: individuos de una pequeña villa de pescadores, en la isla de Marajó, Pará, localizada en la desembocadura del río Amazonas (grupo control); entre profesionales de salud, de Belém, Pará, trabajando en la unidad de radioterapia y pacientes con neoplasia cervicouterina, sometidos a terapia con cobalto. Estos datos sugieren focos concentrados con características comunes en 2 grupos, de profesionales de salud y pacientes con neoplasia. La prueba de χ^2 ha demostrado que la frecuencia de anticuerpos a HTLV-I determinada en esta tesis, no es un evento aleatorio obviamente, y si depende de factores intrínsecos a los grupos humanos probados.

En Japón, después de la catástrofe nuclear en Hiroshima y Nagasaki, se incrementaron significativamente las tasas de neoplasias, principalmente las leucemias (excepto la leucemia linfocítica crónica) y neoplasias uterinas.¹¹⁴ El objetivo de este trabajo no pretendía comprender que factores están involucrados en la expresión del virus, sin embargo, la radiactividad parece estar relacionada con la expresión viral (Figura 23).

El hallazgo del HTLV-I en pacientes con cáncer, particularmente cervicouterino (4/390) es un dato poco reportado, sin embargo ha llevado a algunos grupos a investigar el papel del virus en estas neoplasias. Por otro lado, el encuentro de HTLV-I entre profesionales de salud (3/170), trabajando en unidades de radioterapia, es algo inusitado que amerita ser mejor investigado, para tratar de evaluar si realmente el factor radioactividad está involucrado en la expresión del virus. Sumado al hecho de que también los pacientes con cáncer cervicouterino, antes mencionados, fueron sometidos a la radioterapia, podría suponerse que realmente la radioactividad esté relacionada al mecanismo de expresión de este retrovirus. Es muy improbable que se haya transmitido el virus de un grupo al otro.

En la tesis, los datos indican que el HTLV-I es 3 veces más frecuente entre pacientes cancerosos que entre individuos del grupo control; esta tasa sería más elevada si se tomara en cuenta los "WB indeterminados", estos datos confirman los hallazgos de Reeves *et al.*,¹¹⁵ Asou *et al.*,⁴⁷ y Maruyama *et al.*¹¹⁶ los cuales detectaron valores elevados de seropositividad al virus en este grupo. Maruyama⁸⁹ además estimó que el HTLV-I es 5 veces más prevalente entre pacientes de cáncer que individuos sanos.

Como se mencionó anteriormente, el HTLV-I es considerado el agente etiológico de la leucemia/linfoma de linfocitos T de adultos.^{2,26} Hematólogos de Belém, Pará, creen que la enfermedad ocurre, pero por falta de información médica no es diagnosticada como tal. En la tesis, de 69 casos de hemoblastosis (leucemia linfocítica aguda, mielocítica crónica, linfocítica crónica, linfoma de Hodgkins y no Hodgkins, histiocitoma y plasmacitoma) ninguno presentó anticuerpos anti-HTLV-I de acuerdo a las normas del USPHS, sin embargo, un infante diagnosticado con leucemia linfocítica aguda, presentó anticuerpos anti-p19 y anti-p24 por el método de WB, falleciendo en virtud de una fuerte supresión del sistema inmunológico. Saraiva¹¹⁷ relata un caso de hemoblastosis en Belém, inicialmente considerado "WB indeterminado" pero que meses más tarde presentó reacción para todas las bandas por el WB. Otro caso de interés en este estudio fue un adulto con linfoma no Hodgkins, reaccionando con ELISA a D.O > 2.00, (compatible con la presencia de bandas para el GAG y ENV por el método de WB), este paciente fue a óbito y la muestra de suero se agotó antes que se pudiera confirmar los resultados por WB y PCR, sin embargo, su esposa presentó anticuerpos por los 3 métodos, con bandas para el GAG y ENV en el WB. Estos 2 casos no confirmados de serología al HTLV-I son compatibles con los datos de la literatura; posiblemente la leucemia linfocítica aguda fuera un caso mal diagnosticado de ATLL infantil.^{118,119} En cuanto al caso de linfoma no Hodgkins, también podría ser otro caso mal diagnosticado de ATLL, aunque hay indicios de que el HTLV-I esté involucrado en la etiología del linfoma no Hodgkins.^{120,121}

Previamente al trabajo de tesis, en una investigación en colaboración con Maruyama⁶² se detectaron anticuerpos anti-p19 y anti-p24 en un infante con diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré. En la tesis no se detectaron anticuerpos anti-HTLV-I entre 37 muestras de pacientes con enfermedades neurológicas. Es muy probable que el TSP/HAM ocurra en la Amazonia. El número de pacientes neurológicos probados en la tesis fue muy pequeño, una investigación más amplia podría esclarecer mejor este punto.

Considerándose el hecho de que retrovirus endógenos están involucrados en la morfogénesis y fisiología del embrión^{21,32} y que recientemente se identificó un retrovirus endógeno relacionado al HTLV-I, "HRES-I"⁹⁴ se buscaron anticuerpos anti-HTLV-I entre infantes con síndrome de Down y otras genopatías, sin que se encontraran

anticuerpos anti-HTLV-I entre estas personas. Se piensa en el futuro aumentar la población de individuos con genopatías para comprender mejor la relación entre retrovirus endógenos y exógenos, y su papel en la fisiología y patología en el organismo.

Entre las formas de transmisión del virus, la transfusión de sangre contaminada en bancos de sangre, fue responsable de la amplia diseminación del virus en zonas de alta endemicidad,^{34,90,108} afortunadamente, en la mayoría de los países en que el HTLV-I y II son prevalentes, ya es de rutina la serología para el HTLV-I y II en bancos de sangre. En Brasil, recientemente se tornó obligatoria la serología para el HTLV-I y II en bancos de sangre.

En la tesis se investigó si los individuos involucrados en el estudio epidemiológico habían sido sometidos a transfusión de sangre; de los 12 HTLV-I seropositivos, 4 habían sido transfundidos y los otros 8 reportaron no haber recibido transfusión de sangre (Figura 22).

Saraiva¹¹⁷ reporta que de 804 donadores de sangre de Belém, Pará, 4 individuos presentaron seroreacción para el HTLV-I y 1 de 40 individuos con hemopatías presentó anticuerpos anti-HTLV-I. Estos datos sugieren que los hemocentros del país están contribuyendo a la diseminación del virus. La tasa de 0.5 % de seropositividad al HTLV-I hallada en el banco de sangre de Belém concuerda con la seroprevalencia de 0.31 % en la población de bajo riesgo determinada en la tesis (Tabla 8).

Generalmente los pacientes cancerosos reciben transfusión de sangre, la cual podría haber sido una posible ruta de infección a HTLV-I entre los seropositivos hallados en la tesis. De los 4 pacientes neoplásicos, solamente 1 recibió transfusión de sangre, por lo tanto, la probabilidad de que la infección por el HTLV-I se deba a la transfusión de sangre no representó un factor importante en este grupo.

La transmisión del virus por vía sexual se hizo aparente en 2 casos; uno en que el paciente neoplásico, HTLV-I seroreactivo por PA y ELISA, falleció, con diagnóstico clínico de linfoma no Hodgkins y su esposa clínicamente sana, resultó seropositiva por WB y PCR/hibridación, y el otro caso, un profesional de salud, trabajando como técnico en radioterapia y su esposa, también profesional de salud, pero no radioterapeuta, resultaron seropositivos al HTLV-I por WB y PCR/hibridación.

No se detectaron anticuerpos anti-HTLV-I entre hijos de HTLV-I seropositivos, ya sea infantes o adultos jóvenes; se podría suponer que la edad haya sido la probable razón de la seronegatividad al virus entre estos familiares. Saito *et al.*¹²² reportan la detección del genoma del HTLV-I en 3 neonatos seronegativos al HTLV-I, pero nacidos de madres HTLV-I seropositivas. Probablemente en este estudio, si fuera investigada la presencia de la forma proviral del HTLV en los hijos seronegativos, de madres/padres seropositivos, se tendrían resultados positivos. La edad media de los HTLV-I seropositivos detectados en la tesis es de 44 años, esto concuerda con la edad media observada en otros estudios y con el tiempo de latencia del virus.^{34,35,48} Esta media sube entre pacientes neoplásicos, llegando a 50 años, pero disminuye cuando se trata de individuos del grupo control de la isla de Marajó, pasando a 36 años (Tabla 9).

La predominancia del sexo femenino entre los HTLV-I seropositivos cuenta con fuertes argumentos; la predominancia en la transmisión del virus del hombre a la mujer, sumado al comportamiento sociobiológico del hombre en su medio y la activación del genoma viral en el periodo de lactación.^{35,48,49}

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Con la realización de este trabajo de tesis se pudo llegar a las siguientes conclusiones:

- se pudo corroborar la hipótesis de la existencia del HTLV-I en la Amazonia brasileña, a través de la demostración de anticuerpos en contra del virus, así como por la detección de su forma proviral en todos los individuos seropositivos probados.
- se encontraron variaciones genómicas muy discretas (seguramente puntuales) entre el virus circulante en la Amazonia y el prototipo japonés.
- el análisis de las bandas en el WB de la reacción de los péptidos virales del HTLV-I con el suero de los individuos evaluados como seropositivos, asociado al análisis de secuencias genómicas del HTLV-I ubican taxonómicamente al HTLV-I circulante en la Amazonia, muy cercanamente a los prototipos de Japón, Caribe y Africa y distante a la cepa de HTLV-I hallada en las islas del Pacífico sur.
- la seroprevalencia de HTLV-I fue 3 veces mayor en población de alto riesgo a la infección comparada con la población de bajo riesgo principalmente en los grupos de profesionales de salud y pacientes neoplásicos expuestos a la radiactividad.
- se logró localizar las áreas seroprevalentes a HTLV-I en la Amazonia brasileña y determinar en que grupos humanos hay mayor frecuencia del virus.

Considerase que los hallazgos de HTLV-I entre profesionales de salud y pacientes con neoplasia cervicouterina, expuestos ambos a la radioactividad son inéditos y de gran importancia.

El polimorfismo conformacional de cadenas simple de DNA encontrado para el HTLV-I nos sugiere que ocurre mutaciones, determinadas por la relación virus-huésped en un mismo individuo.

La detección del HTLV-I entre individuos de bajo riesgo de contraer infección al virus, individuos del grupo control (3/770) y amerindios amazónicos (1/487), abre paso a trabajos de investigación en la búsqueda de las rutas de entrada del virus en estos grupos y la relación huésped-parásito. Por otro lado, por tratarse de grupos humanos en donde la asistencia médica y medidas de salud pública son muy carentes, se considera necesario una amplia divulgación de estos datos.

El hecho de no hallarse indicios de la circulación del virus entre los inmigrantes japoneses y sus descendientes (0/100), considerados de alto riesgo, muy posiblemente indique la necesidad de aumentar el número de muestras probadas. Lo mismo sucede con los grupos de individuos con neuropatías (0/37), genopatías y sus progenitores (0/60), pacientes ginecológicos (0/104) y donadores de sangre (0/200).

La introducción de la metodología para la extracción de ácido nucleico de suero/plasma para pruebas moleculares como el PCR/hibridación, es un gran paso para estudios epidemiológicos, en donde la infraestructura laboratorial es deficiente, no permitiendo la ejecución de técnicas más elaboradas. Por otro lado la introducción del análisis de SSCP para estudios moleculares del genoma del HTLV-I es reciente y nuestros resultados aunque preliminares son prometedores.

La comparación hecha entre las técnicas de PA y ELISA, en que se demuestra mínimas diferencias en la sensibilidad entre estas técnicas, favorecen la utilización del PA en pruebas de tamizaje* para anticuerpos anti-HTLV-I/II, por su rapidez y simplicidad en su ejecución, sin que se necesite de mucha infraestructura.

El empleo de glicoproteínas recombinantes para la distinción del HTLV-I del tipo II, aún es preliminar y no la utilizamos. Sin embargo, estos productos recombinantes son muy prometedores para el diagnóstico de infecciones retrovirales y podría reemplazar el PCR/hibridación, ya que son tecnologías que exigen instalaciones adecuadas, personal preparado y además son caras comparadas a la serología con productos recombinantes, quedándose el PCR/hibridación para estudios que exijan más detalles.

*Utilizada únicamente para pruebas de tamizaje, nunca en diagnóstico por infección a HTLV-I

9.APENDICE.

SOLUCIONES UTILIZADAS.

1.Solución de Extracción de DNA de suero/plasma.

**- NaI 6 M / EDTA 13 mM / 0.5 % N-lauril sarcosinato de sodio/
10 µg glucógeno/ Tris-HCl 26 mM, pH 8.0**

2.Amplificación génica, solución de reacción.

**-10 X concentrado: Tris-HCl 200 mM, pH 8.7/ KCl 100 mM /
(NH₄)₂SO₄100mM, MgCl₂ 20 mM, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml
Seroalbumina bovina.**

3. Electrophoresis y Inmunoelectrotransferencia

**- Solución TBE: TRIS-BORATO 45 Mm, pH 8.3, EDTA 4 mM
y 10 % de glicerol.**

-Hydrolink gel a 20 %.

-Azul de bromofenol a 0.05 %.

-Bromuro de etidio a 100 µg/ml.

4.Pré-hibridación e Hibridación.

**-solución de maleato (SSC 5 X): Acido maleico 100 mM, NaCl
150 mM; pH 7.5.**

**-5X SSC/ reactivo bloqueador a 1%/ N-lauroilsarcosinato de
sodio 0.1 %/ dodecil sulfato de sodio a 0.002 %.**

-solución de lavado (SSC 2 X/ SSC 1 X): SDS a 0.1 %.

-formamida a 50 %.

5. Detección inmunológica.

-reactivo bloqueador a 1 % en SSC.

**-anti-digoxigenina-AP (Fosfatasa alcalina) en solución de
trietanolamina, 50 mmol/l; NaCl, 3mmol/l; MgCl₂, 1mmol/l;
ZnCl₂, 0.1 mmol/l; seroalbumina bovina, 1 %; pH 7.6.**

**TABLA 1. DISCRIMINACION DE LOS GRUPOS
HUMANOS INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO
EPIDEMIOLOGICO.**

| GRUPOS HUMANOS | MASCULINO(%) | FEMENINO (%) | TOTAL (%) |
|--|---------------------|-----------------------|--------------------|
| GRUPO CONTROL | 300 (38.96) | 470 (61.03) | 770 (27.53) |
| PROFESIONALES DE SALUD | 19 (11.17) | 151 (88.82) | 170 (6.03) |
| PACIENTES NEOPLÁSICOS | 107 (27.4 3) | 283 (72.56) | 390 (13.85) |
| AMERINDIOS AMAZONICOS | 227 (46.61) | 260 (53.38) | 487 (17.30) |
| FAMILIARES DE HTLV-I SEROPOSITIVOS | 4 (30.76) | 9 (69.2 3) | 13 (0.46) |
| INMIGRANTES JAPONESES Y DESCENDIENTES | 73 (73.0) | 27 (27.0) | 100 (3.55) |
| PACIENTES DE GINECOLOGIA | — | 104 (100.0) | 104 (3.69) |
| PACIENTES CON NEUROPATIAS | 21 (56.75) | 16 (43.24) | 37 (1.31) |
| PACIENTES CON GENOPATIAS | 17 (50.0) | 17 (50.0) | 34 (1.20) |
| FAMILIARES DE PACIENTES CON GENOPATIA | 11 (42.30) | 15 (57.69) | 26 (0.92) |
| HIV SEROPOSITIVOS | 273 (86.39) | 43 (13.60) | 316 (11.22) |
| PACIENTES CON MALARIA | 168 (100.0) | — | 168 (5.96) |
| DONADORES DE SANGRE | 187 (93.50) | 13 (6.50) | 200 (7.10) |
| TOTAL | 1,407 (49.98) | 1,408 (50.02) | 2,815 (100.0) |

TABLA 2. DISCRIMINACION DE LAS ESPECIES DE PRIMATES NO HUMANOS DE AMAZONIA Y AFRICA INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO.

| PRIMATES NO HUMANOS | MACHOS (%) | HEMBRAS (%) | TOTAL (%) |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Cebus apella</i> | 36 (62.1) | 22 (37.9) | 58 (36.7) |
| <i>Cebus albifrons</i> | 3 (60.0) | 2 (40.0) | 5 (3.2) |
| <i>Cebus nigrivittatus</i> | 2 (40.0) | 3 (60.0) | 5 (3.2) |
| <i>Callicebus moloch</i> | 1 (16.7) | 5 (83.3) | 6 (3.8) |
| <i>Callithrix jacchus jacchus</i> | 7 (53.8) | 6 (46.2) | 13 (8.2) |
| <i>Callithrix argentata argentata</i> | 1 (100.0) | — | 1 (0.6) |
| <i>Aotus agarae infulatus</i> | 14 (41.2) | 20 (58.8) | 34 (21.5) |
| <i>Alouata belzebul belzebul</i> | 1 (50.0) | 1 (50.0) | 2 (1.3) |
| <i>Chiropotes satanas utahicki</i> | 4 (40.0) | 6 (60.0) | 10 (0.6) |
| <i>Cercopithecus aethiops*</i> | 11(45.8) | 13 (54.2) | 24 (15.2) |
| TOTAL | 80(50.6) | 78 (49.4) | 158 (100.0) |

*Simio Africano

TABLA 3. AMERINDIOS AMAZONICOS INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO.

| TRIBUS INDIGENAS | MASCULINO (%) | FEMENINO (%) | TOTAL (%) |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| GALIBIS | 48 (48.48) | 51 (51.51) | 99 (20.32) |
| KUBENKROKE | 20 (32.78) | 41 (67.21) | 61 (12.52) |
| MUNDURUKUS | 43 (46.23) | 50 (53.76) | 93 (19.09) |
| PALIKUR | 26 (53.06) | 23 (46.93) | 49 (10.06) |
| YANOMAMI | 42 (46.15) | 49 (53.84) | 91 (18.68) |
| WAIÁPI | 48 (51.06) | 46 (48.93) | 94 (19.30) |
| TOTAL | 227 (46.61) | 260 (53.38) | 487 (100.0) |

**TABLA 4. "PRIMERS" EMPLEADOS EN LA
AMPLIFICACION ENZIMATICA MOLECULAR DE LAS
REGIONES LTR Y GAG DEL HTLV-I Y TAX DEL HTLV-I
Y HTLV-II.**

| REGION GENICA DEL HTLV-I | LTR | GAG | TAX |
|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--|
| SECUENCIA 5'-3' DEL "PRIMER" | 582 A 603¹ | 824 A 842² | 7358 A 7377 / 7248 A 7267³ |
| SECUENCIA 3'-5' DEL "PRIMER" | 744 A 764⁴ | 1017 A 1039⁵ | 7496 A 7516 / 7386 A 7406⁶ |

1. TGACCCTGCTTGCTCAACTCTA (22 MER)

2. ATGGGCCAAATCTTTTCCC (19 MER)

3. CGGATACCCAGTCTACGTGT (SECUENCIA COMÚN A HTLV-I Y II, 20 MER)

4. TCTCTCCTGAGAGTGCTATAG (21 MER)

5. GAGTAGGCTGGCTAGGAGGGAGT (23 MER)

6. GAGCCGATAACGCGTCCATCG (SECUENCIA COMÚN A HTLV-I Y II, 21 MER)

TABLA 5. SONDAS MOLECULARES UTILIZADAS EN LA DETECCION DE LAS REGIONES AMPLIFICADAS DEL LTR Y GAG DEL HTLV-I Y TAX DEL HTLV-I Y HTLV-II.

| REGION GENICA DEL HTLV-I | SECUENCIA 3'-5' DE LA SONDA |
|---------------------------------|---|
| LTR | 655 A 624 (32 MER)¹ |
| GAG | 931 A 960 (30 MER)² |
| TAX* | 7447 A 7486 / 7337 A 7376 (40 MER)³ |

1.GGGTGGAACTTTTCGATCTGTAACGGCGCAGAA

2.CGGTCCCTCCAGTTACGATTTCCACCAGTT

3.ACGCCCTACTGGCCACCTGTCCAGAGCATCAGATCACCTG

* REGION COMUN A HTLV-I Y II.

**TABLA 6. NUMERO DE INDIVIDUOS SEROREACTORES
POR EL METODO DE PA, ELISA Y WB.**

| GRUPOS HUMANOS | MASCULINO (%) | FEMENINO(%) | TOTAL(%) |
|---|------------------------|-------------------------|------------------------|
| GRUPO CONTROL | 0/300 (0) | 3/470 (0.63) | 3/770 (0.38) |
| PROFESIONALES DE SALUD | 1/19 (5.26) | 2/151 (1.32) | 3/170 (1.76) |
| INDIGENAS AMAZONICOS | 1/227 (0.44) | 0/260 (0) | 1/487 (0.20) |
| FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I POSITIVO¹ | 0/4 (0) | 2/10 (20) | 2/14 (14.28) |
| INDIGENAS JAPONESES² | 0/73 (0) | 0/27 (0) | 0/100 (0) |
| PACIENTES NEOPLASICOS | 0/107 (0) | 4/283 (1.41) | 4/390 (1.02) |
| PACIENTES DE GINECOLOGIA | — | 0/104 (0) | 0/104 (0) |
| PACIENTES CON NEUROPATIAS | 0/21 (0) | 0/16 (0) | 0/37 (0) |
| PACIENTES CON GENOPATIA | 0/17 (0) | 0/17 (0) | 0/34 (0) |
| FAMILIARES DE PAC. CON GENOPATIA³ | 0/11 (0) | 0/15 (0) | 0/26 (0) |
| TOTAL | 2/779 (0.25) | 10/1,352* (0.73) | 12/2,131 (0.56) |

1.FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPositIVOS 2.INMIGRANTES JAPONESES Y SUS DESCENDIENTES 3.FAMILIARES DE PACIENTES CON GENOPATIA 4. UNA PERSONA DEL SEXO FEMENINO PERTENENCE TANTO AL GRUPO DE PROFESIONAL DE SALUD COMO AL GRUPO DE FAMILIAR DE INDIVIDUO HTLV-I SEROPositIVO.

TABLA 7. COMPARACION DE LA FRECUENCIA DE SEROPOSITIVIDAD A HTLV-I ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS TOMANDO COMO REFERENCIA EL GRUPO CONTROL.

| GRUPOS | GRADO DE INCIDENCIA RELATIVO AL GRUPO CONTROL |
|-------------------------------|--|
| PROFESIONALES DE SALUD | 4.63 VECES MAYOR (1.76/0.38) |
| PACIENTES NEOPLASICOS | 2.68 VECES MAYOR (1.02/0.38) |
| AMERINDIOS AMAZONICOS | 0.52 VECES MENOR (0.20/0.38) |
| FAM. HTLV-I POSITIVO* | 37.57 VECES MAYOR (14.28/0.38) |

*FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS

TABLA 8. SEROPREVALENCIA A HTLV-I ENTRE INDIVIDUOS DE BAJO RIESGO Y ALTO RIESGO DE CONTRAER INFECCION RETROVIRAL.

| GRUPOS | INDIVIDUOS POSITIVOS A HTLV-I (%) |
|--------------------------------|--|
| BAJO RIESGO¹ | 4 (0.18) |
| ALTO RIESGO² | 8 (0.37) |
| TOTAL | 12 (0.56) |

1.INDIVIDUOS DEL GRUPO CONTROL Y AMERINDIOS AMAZONICOS

2.PROFESIONALES DE SALUD, INMIGRANTES JAPONESES Y SUS DESCENDIENTES, PACIENTES CON NEOPLASIAS, INDIVIDUOS CON NEUROPATIAS, GENOPATIAS Y FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS.

**TABLA 9. MEDIA GENERAL DE EDAD ENTRE LOS
INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS
AL HTLV-I.**

| GRUPOS DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS | EDAD MEDIA (AÑOS) |
|--|--------------------------|
| PROFESIONALES DE SALUD | 40.0 |
| GRUPO CONTROL | 35.6 |
| AMERINDIOS AMAZONICOS | 11.0 |
| FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS | 59.0 |
| PACIENTES CON NEOPLASIA CERVICOUTERINA | 49.8 |
| EDAD MEDIA GENERAL | 39.1 |

**TABLA 10. CORRELACION ENTRE VALORES DE D.O*
DETECTADOS POR ELISA Y POSITIVIDAD POR W B
PARA ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I.**

| VALORES DE D.O * | BANDAS EN EL W.B. | CLASIFICACION |
|-----------------------------|---|----------------------|
| >2.00 | p19, p24, p29, p34, p36,p42, gp46, gp61/68 | SEROPOSITIVO |
| >0.921 Y <2.00 | p19 Y p24 | INDETERMINADO |
| <0.921 | — | SERONEGATIVO |


***PUNTO DE CORTE : 0.391**

**TABLA 11. INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS A HTLV-I/II
POR LA PRUEBA DE ELISA A D.O* ENTRE 0.920 A
VALORES SUPERIOR A 2.00.**

| GRUPOS | 2.00 ≥ D.O ≥ 0.920 (%) | D.O ≥ 2.00 |
|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| DONADOR DE SANGRE | 0/200 (0) | 0/200 (0) |
| PACIENTE CON MALARIA | 4/168 (2.38) | 0/168 (0) |
| INDIVIDUO HIV SEROPOSITIVO | 15/316 (4.74) | 2/316 (0.63) |
| SIMIO AMAZONICO | 0/134 (0) | 0/134 (0) |
| SIMIO AFRICANO | 4/24 (16.66) | 2/24 (8.33) |

*PUNTO DE CORTE: 0.391

**TABLA 12. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE
LOS PEPTIDOS Y GLICOPEPTIDOS DEL HTLV-I
DETECTADOS EN EL METODO SEROLOGICO DE WB.**

| | | | | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
|  | p19 | | | | | | | |
| p24 | 0.8345 | p24 | | | | | | |
| p29 | 0.6471 | 0.5400 | p29 | | | | | |
| p34 | 0.5883 | 0.4909 | 0.9091 | p34 | | | | |
| p36 | 0.6471 | 0.5400 | 1.00 | 0.9091 | p36 | | | |
| p42 | 0.6853 | 0.7833 | 0.6894 | 0.6267 | 0.6894 | p42 | | |
| p46 | 0.5547 | 0.6846 | 0.6291 | 0.7171 | 0.6291 | 0.8740 | p46 | |
| gp61/68 | 0.7050 | 0.5883 | 0.7464 | 0.8345 | 0.7464 | 0.7510 | 0.8593 | gp61/68 |
| p53/55 | 0.0748 | 0.3364 | 0.2357 | 0.2143 | 0.2357 | 0.3038 | 0.2091 | 0.0748 |

p=0.001

TABLA 13. COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LAS REGIONES AMPLIFICADAS DEL LTR, GAG Y TAX.

| | TAX | GAG | |
|-----|--------|--------|-----|
| LTR | 0.9179 | 0.8154 | |
| | | 0.7485 | TAX |

p=0.001

**TABLA 14. SINOPSIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
CON LOS PEPTIDOS/GLICOPEPTIDOS DE HTLV-I EN
WB.**

| HTLV-I SEROPOSITIVO | SEXO | p19 | p24 | p29 | p34 | p36 | p42 | gp46 | p53/55 | gp61/68 |
|--|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|----------------|
| #3 neop. cervicouterina¹ * | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #6 amerindio Waiãpi | Masc. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #8 profesional de salud² * | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #9 profesional de salud * | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #10 profesional de salud * | Masc. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #14 neop. cervicouterina * | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| #16 neop. cervicouterina | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #17 neop. cervicouterina | Fem. | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| #19 grupo control * | Masc. | + | + | + | - | + | + | + | + | - |
| #22 Fam.HTLV-I³ | Fem. | + | + | + | - | + | + | + | + | - |
| #27 grupo control * | Masc. | + | + | + | - | + | + | + | + | - |
| #36 grupo control | Masc. | + | + | + | - | + | + | + | + | - |

¹ Neoplasia cervicouterina ² Individuo profesional de salud también clasificado como Familiar de individuo HTLV-I seropositivo ³ Familiar de Individuo HTLV-I seropositivo.

*Individuos sometidos al análisis de SSCP.

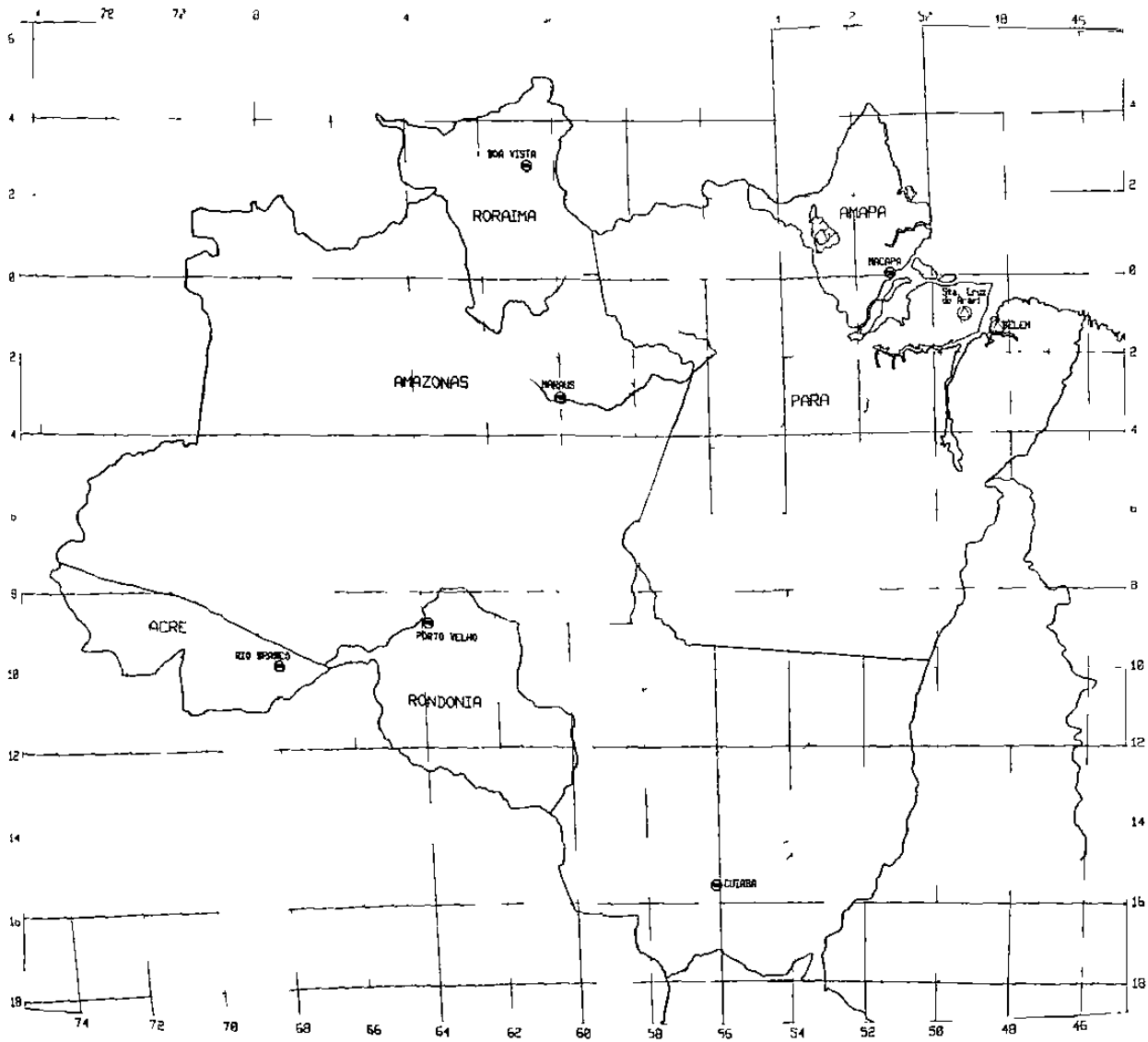


FIGURA 1. MAPA DE LA AMAZONIA BRASILEÑA EN QUE SE REALIZO LA COLECTA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA EL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO.

COLECTA DE MUESTRAS DE SANGRE (2.815 MUESTRAS)



OBTENCION DE SUERO O PLASMA



DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I/II



PA (50/2,131*)



ELISA (2/684)



ELISA (34/50)



WB (12/34) / WB INDETERMINADAS (6/34)



SELECCION DE MUESTRAS CON MEJOR PATRON POR EL W B (7/12)



PCR (7/7) / HIBRIDACION (7/7)



ANALISIS DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL

**DE UN TOTAL DE 2,815 MUESTRAS, 684 MUESTRAS FUERON PROBADAS UNICAMENTE POR ELISA*

FIGURA 2. FLUJOGRAMA EMPLEADO EN EL TRABAJO DE TESIS.

Patrones de aglutinación

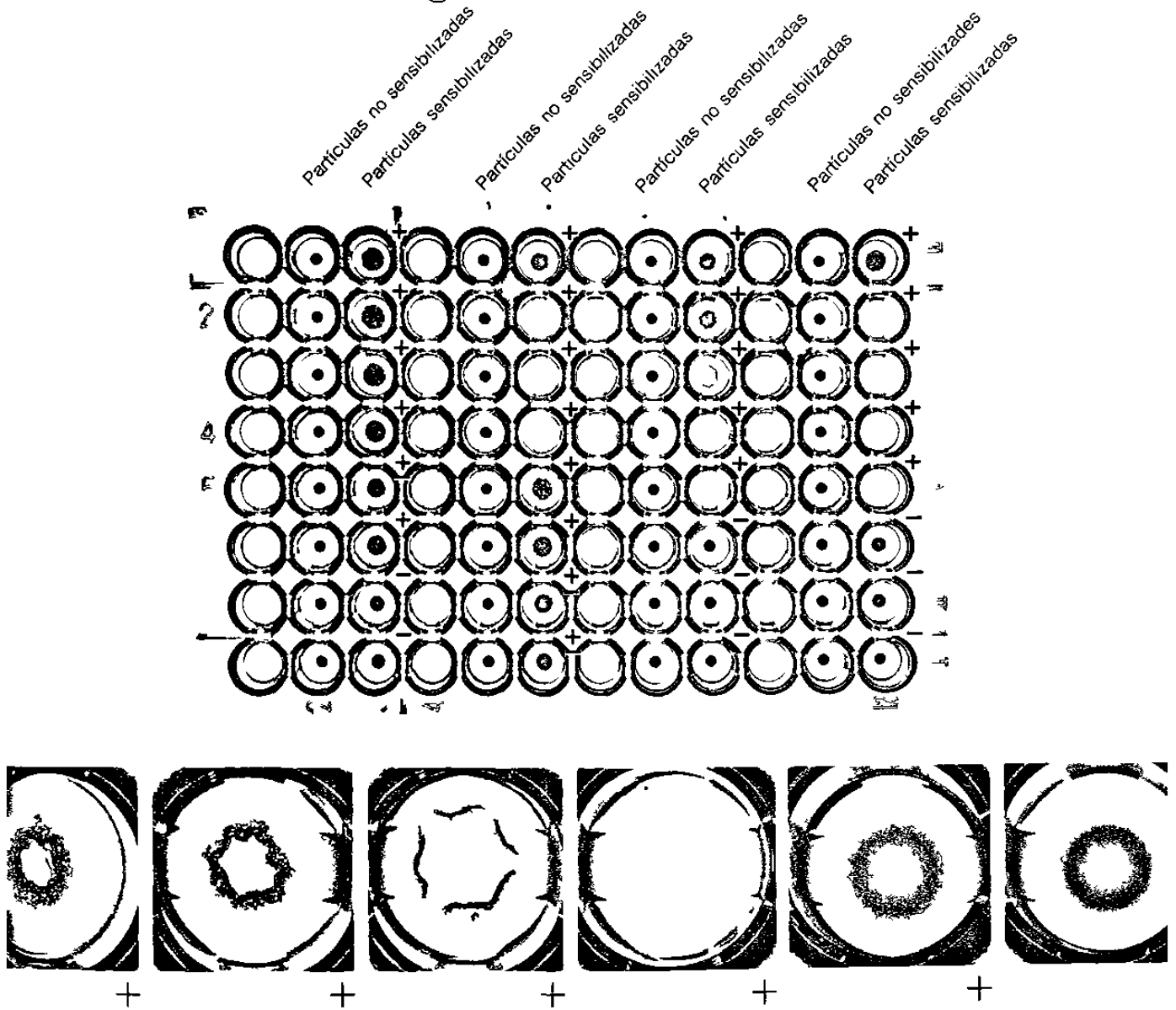
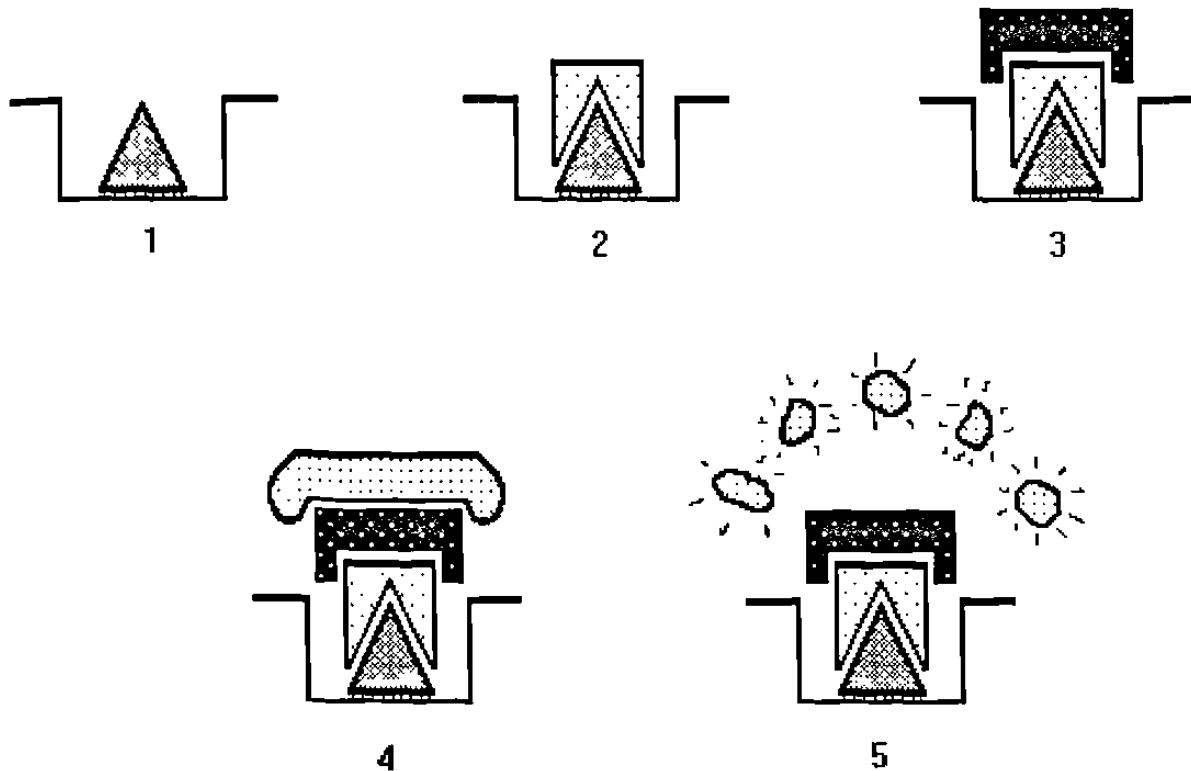


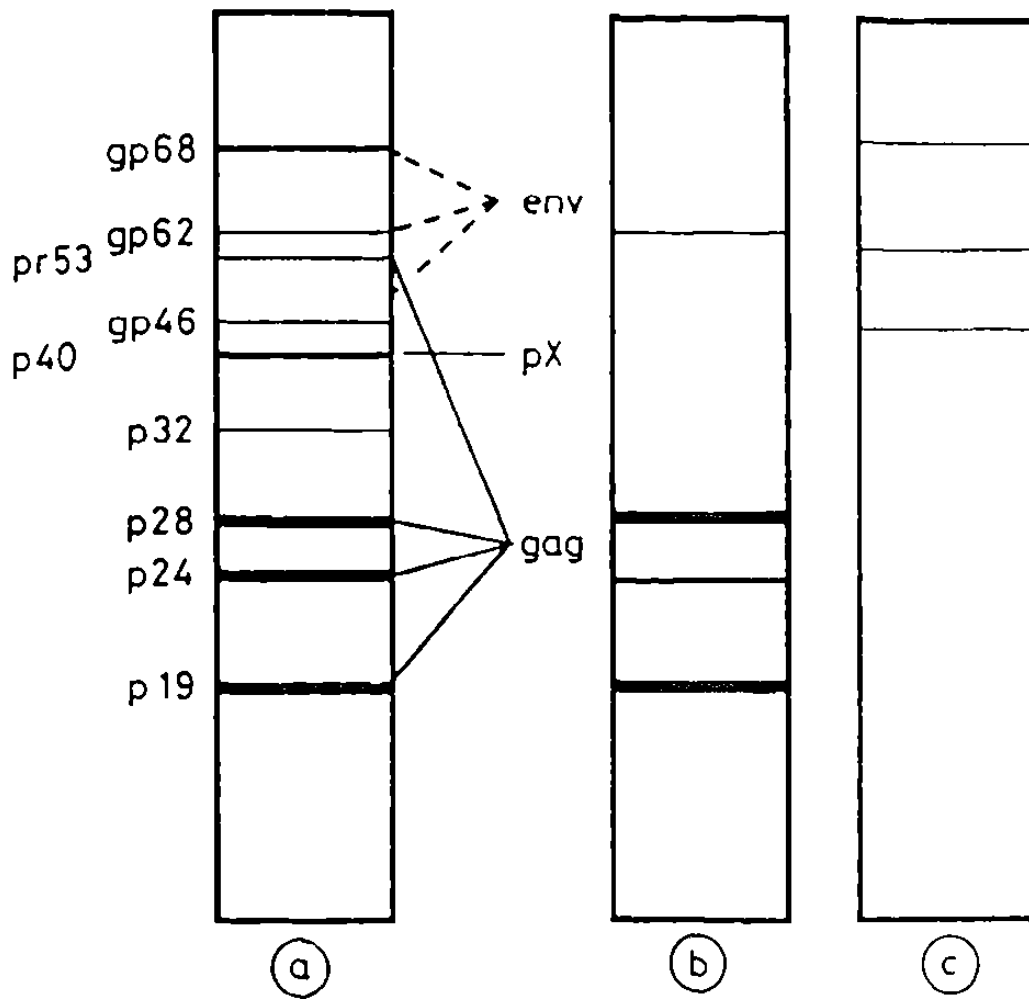
FIGURA 3. METODO DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE GELATINA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-HTLV-I.

ELISA



1. Adición del antígeno viral de HTLV-I(lisado celular).
2. Adición de muestras de suero/plasma a ser probado.
3. Adición de Anti-IgG humana conjugada a la fosfatasa alcalina.
4. Adición del sustrato p-nitrofenilfosfato.
5. Desdoblamiento del sustrato con coloración amarilla del medio.

FIGURA 4. METODO SEROLOGICO DE ELISA.



- a. Bandas revelando péptidos de GAG, ENV y P_x; patrón positivo.
 b. Bandas revelando péptidos de GAG; patrón indeterminado
 c. Bandas revelando glicopéptidos de ENV; patrón indeterminado.

FIGURA 5. PATRONES DE SEROREACTIVIDAD A PEPTIDOS Y GLICOPEPTIDOS DE HTLV-I.

LTR 582-603

5 [redacted] [barcode] 3

3 [barcode] [redacted] 5

LTR 764-744

GAG 824-842

5 [redacted] [barcode] 3

3 [barcode] [redacted] 5

GAG 1039-1017

TAX* 7358-7377(I) 7248-7267(II)

5 [redacted] [barcode] 3

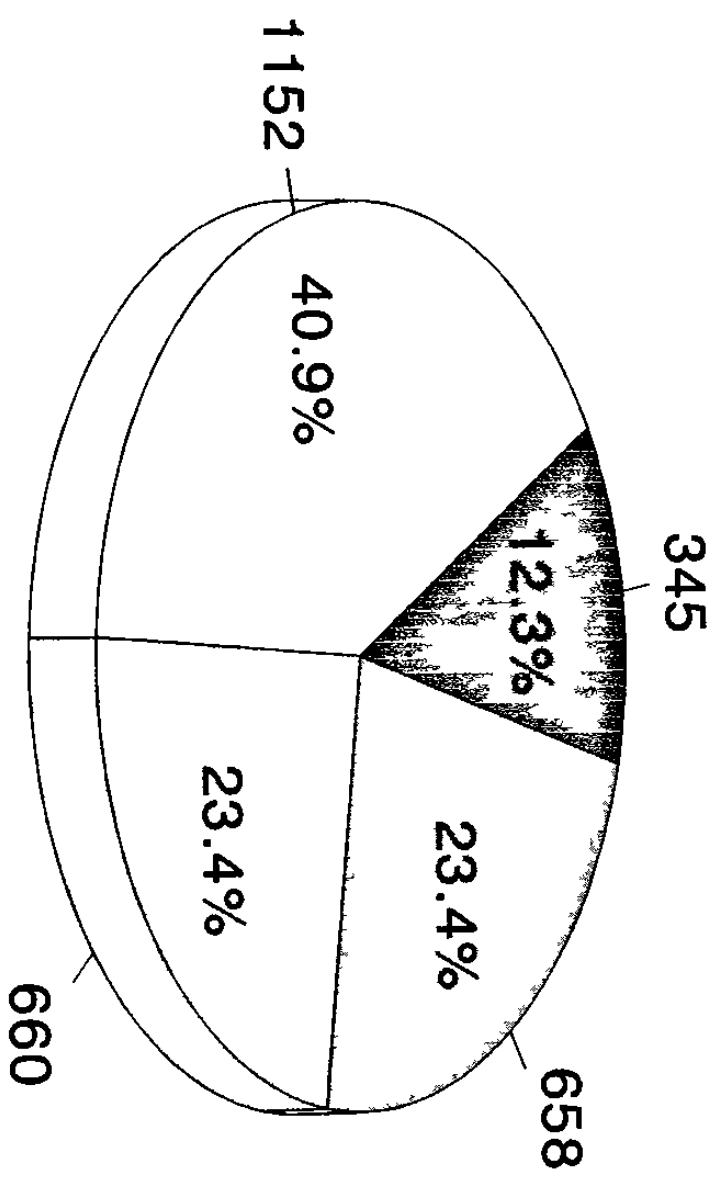
3 [barcode] [redacted] 5

TAX*7516-7496(I) 7406-7586 (II)

FIGURA 6. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS REGIONES DEL HTLV-I* AMPLIFICADAS CON PRIMERS PARA LTR, GAG Y TAX

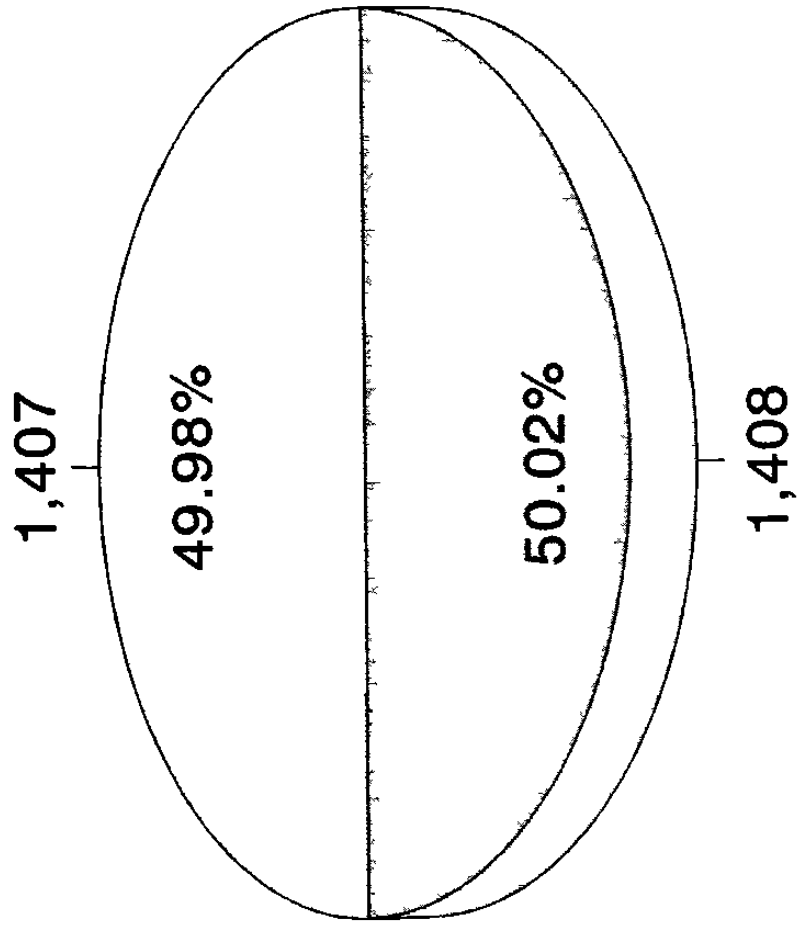
*La region TAX es común a HTLV-I y HTLV-II

FIGURA 7. DISTRIBUCION Y FRECUENCIA DE LA EDAD ENTRE LOS GRUPOS INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO.



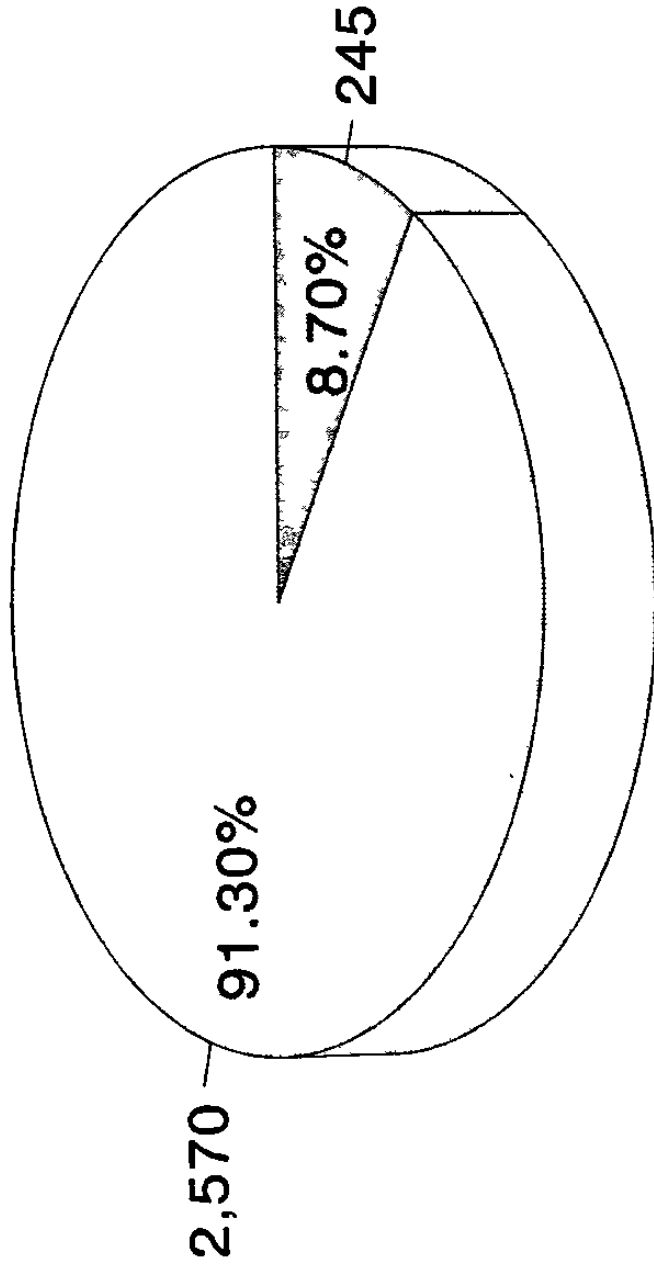
■ < 13 AÑOS □ 13 A 27 AÑOS □ 28 A 50 AÑOS ▨ > 50 AÑOS

FIGURA 8. NUMERO Y PORCENTAJE DE INDIVIDUOS DISTRIBUIDOS POR SEXO INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO.



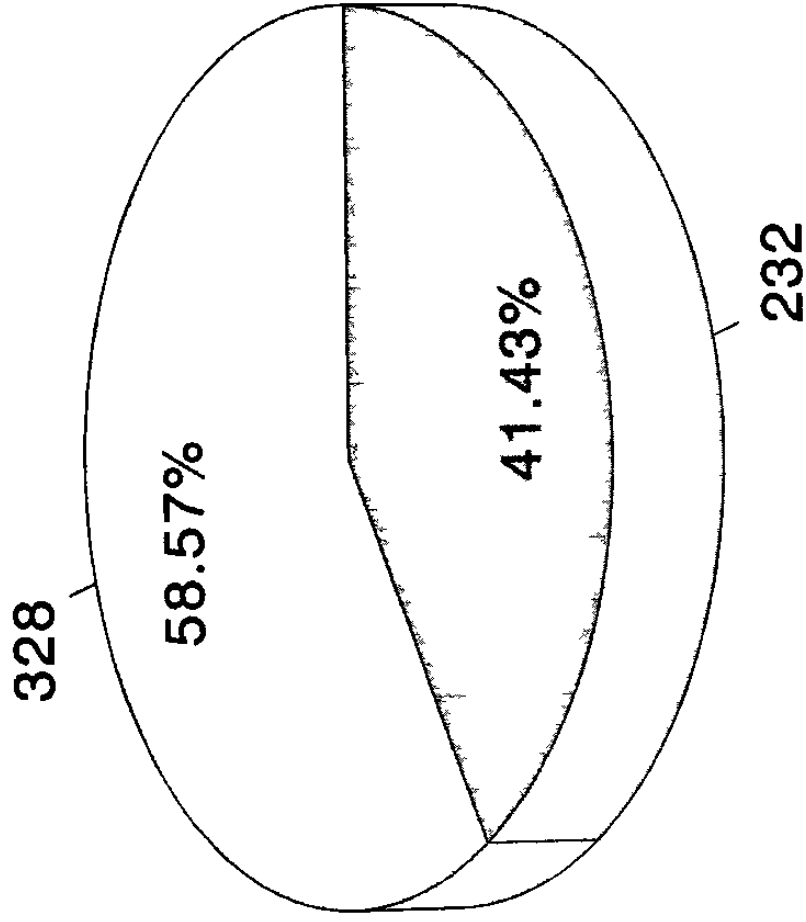
MASCULINO FEMENINO

FIGURA 9. NUMERO Y PORCENTAJE DE INDIVIDUOS TRANSFUNDIDOS CON SANGRE Y DERIVADOS EN EL ESTUDIO.

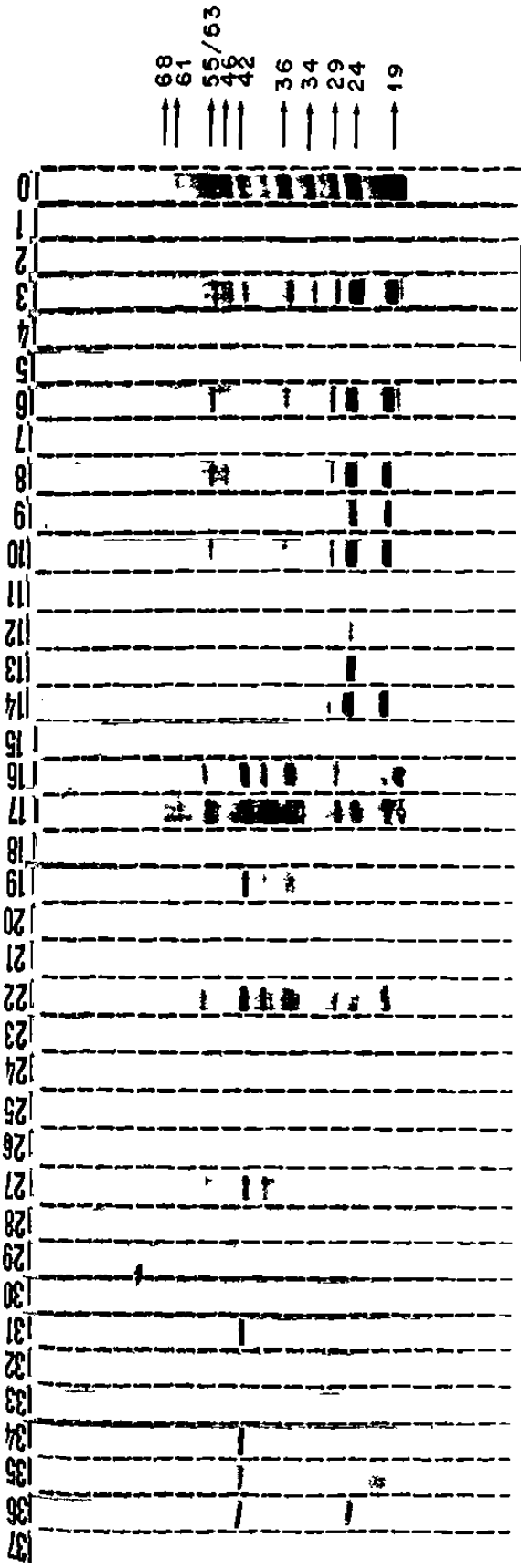


TRANSFUNDIDOS NO TRANSFUNDIDOS

FIGURA 10. INDIVIDUOS DEL HOSPITAL DE CANCER EXPUESTOS A LA RADIATIVIDAD.



EXPUESTOS NO EXPUESTOS



CONTROL POSITIVO: # 0

CONTROL NEGATIVO: # 1, 2, 15.

INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS: #3¹, 6³, 8², 9², 10², 14¹, 16¹, 17¹, 19⁵, 22⁴, 27⁵, 36⁵.

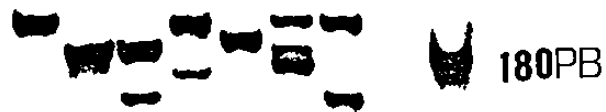
INDIVIDUOS INDETERMINADOS: #12, 13, 31, 32, 34, 35.

INDIVIDUOS SERONEGATIVOS: #4, 5, 7, 11, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 18.

¹NEOPLASIA CERVICOUTERINA ²PROFESIONAL DE SALUD ³AMERINDIO WALÁPI ⁴FAMILIAR DE HILV-1
⁵SEROPOSITIVO; *GRUPO CONTROL

FIGURA 11. PATRONES DE SEROREACCION EN EL WESTERN BLOT.

1 2 3 4 5 6 7 8



- #1: PROFESIONAL DE SALUD**
- #2: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #3: PROFESIONAL DE SALUD**
- #4: PROFESIONAL DE SALUD**
- #5: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #6: GRUPO CONTROL**
- #7: GRUPO CONTROL**
- #8: CONTROL POSITIVO (Lma-66/HTLV-I)**

**FIGURA 12. HIBRIDACION CON SONDAS ESPECIFICAS
TAX DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON
"PRIMER" TAX HTLV-I**



- #1: PROFESIONAL DE SALUD**
- #2: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #3: PROFESIONAL DE SALUD**
- #4: PROFESIONAL DE SALUD**
- #5: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #6: GRUPO CONTROL**
- #7: GRUPO CONTROL**
- #8: CONTROL POSITIVO (Lma-66/HTLV-I)**

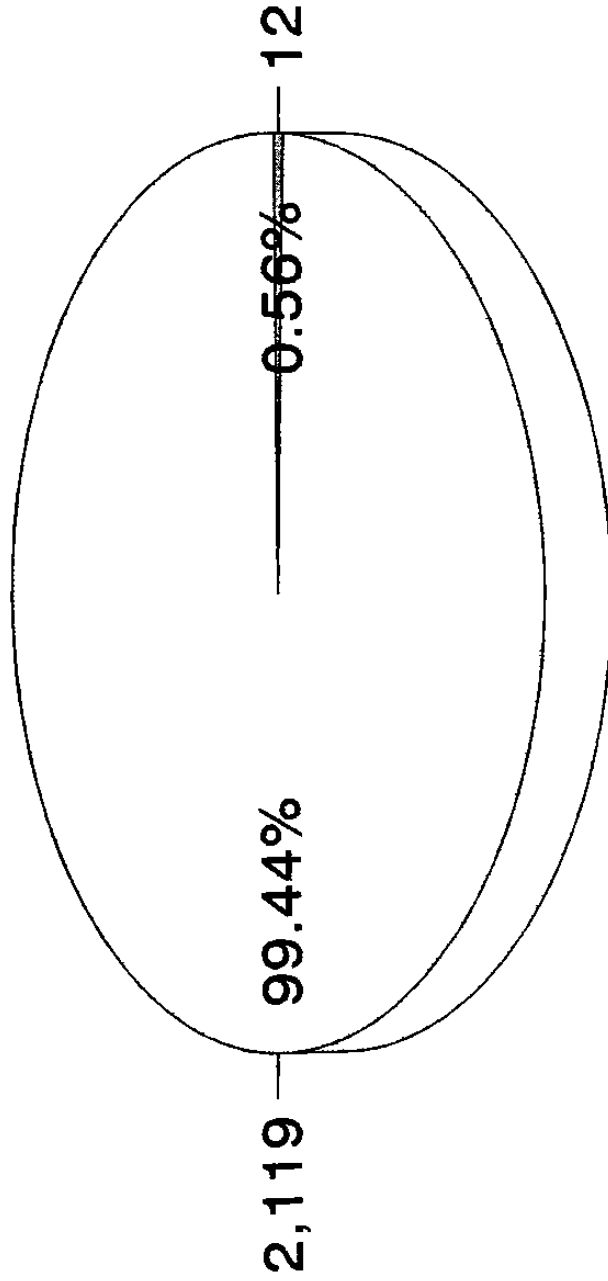
**FIGURA 13. HIBRIDACION CON SONDAS ESPECIFICAS
GAG DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON
"PRIMER" GAG HTLV-I.**



- #1: PROFESIONAL DE SALUD**
- #2: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #3: PROFESIONAL DE SALUD**
- #4: PROFESIONAL DE SALUD**
- #5: NEOPLASIA CERVICOUTERINA**
- #6: GRUPO CONTROL**
- #7: GRUPO CONTROL**
- #8: CONTROL POSITIVO (Lma-66/HTLV-I)**

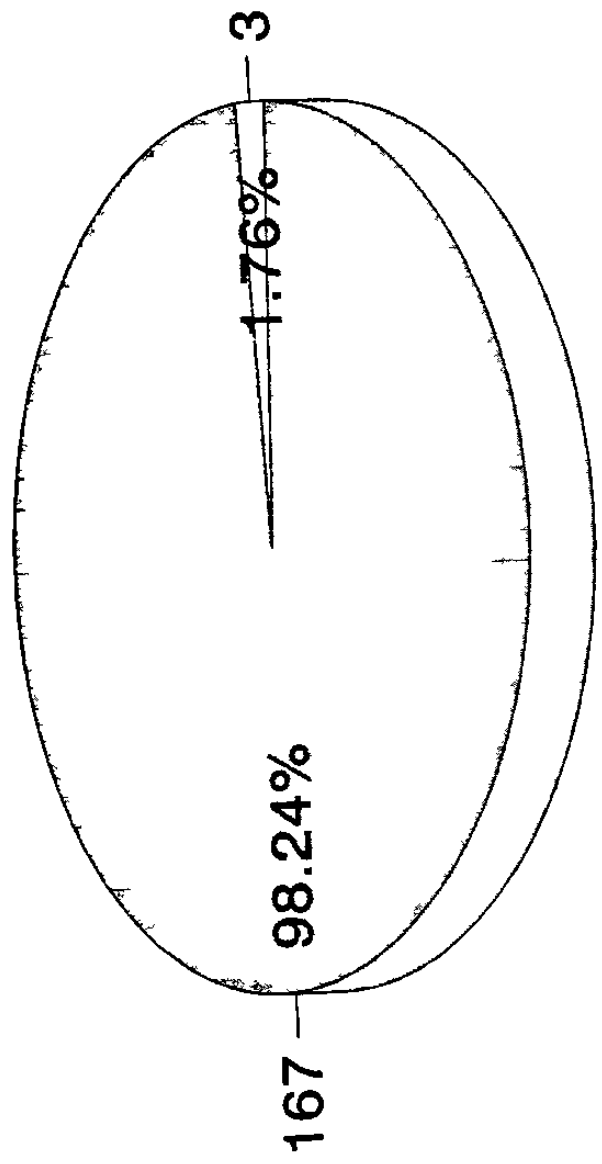
**FIGURA 14. HIBRIDACION CON SONDAS ESPECIFICAS
LTR DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON
"PRIMER" LTR HTLV-I.**

FIGURA 15. SEROPREVALENCIA GENERAL DEL HTLV-I EN LA AMAZONIA BRASILEÑA.



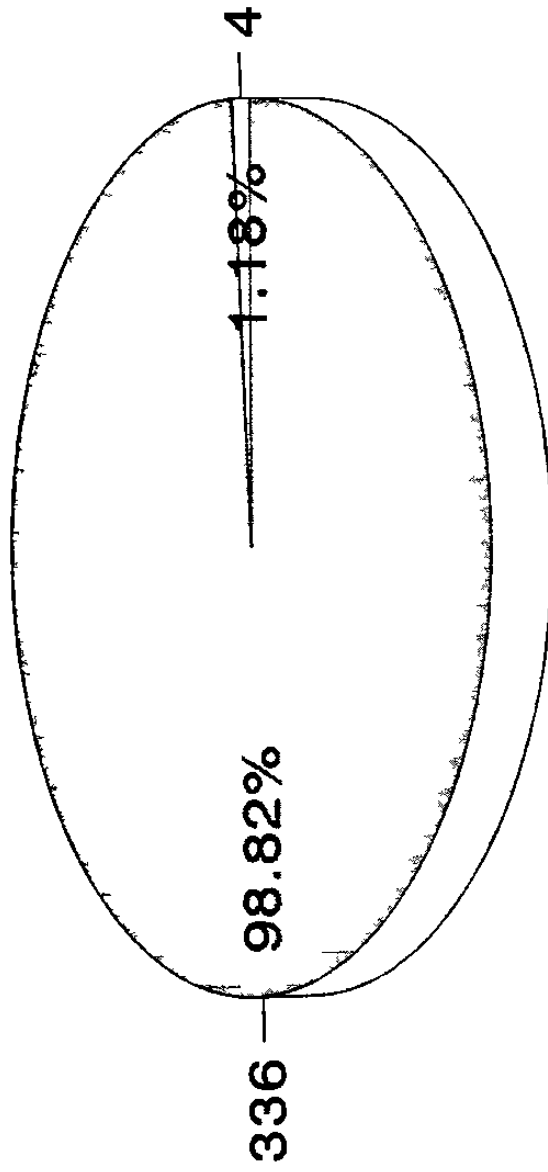
SERONEGATIVOS SEROPOSITIVOS

FIGURA 16. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE PROFESIONALES DE SALUD.



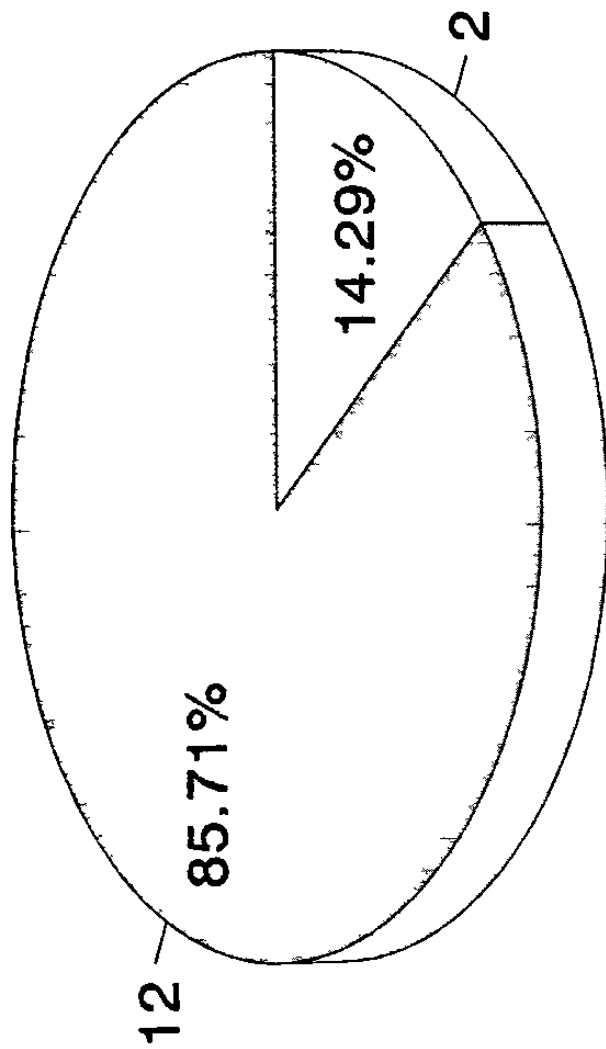
□ HTLV-I SEROPOSITIVOS ■ HTLV-I SERONEGATIVOS

FIGURA 17. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE PACIENTES CON NEOPLASIA.



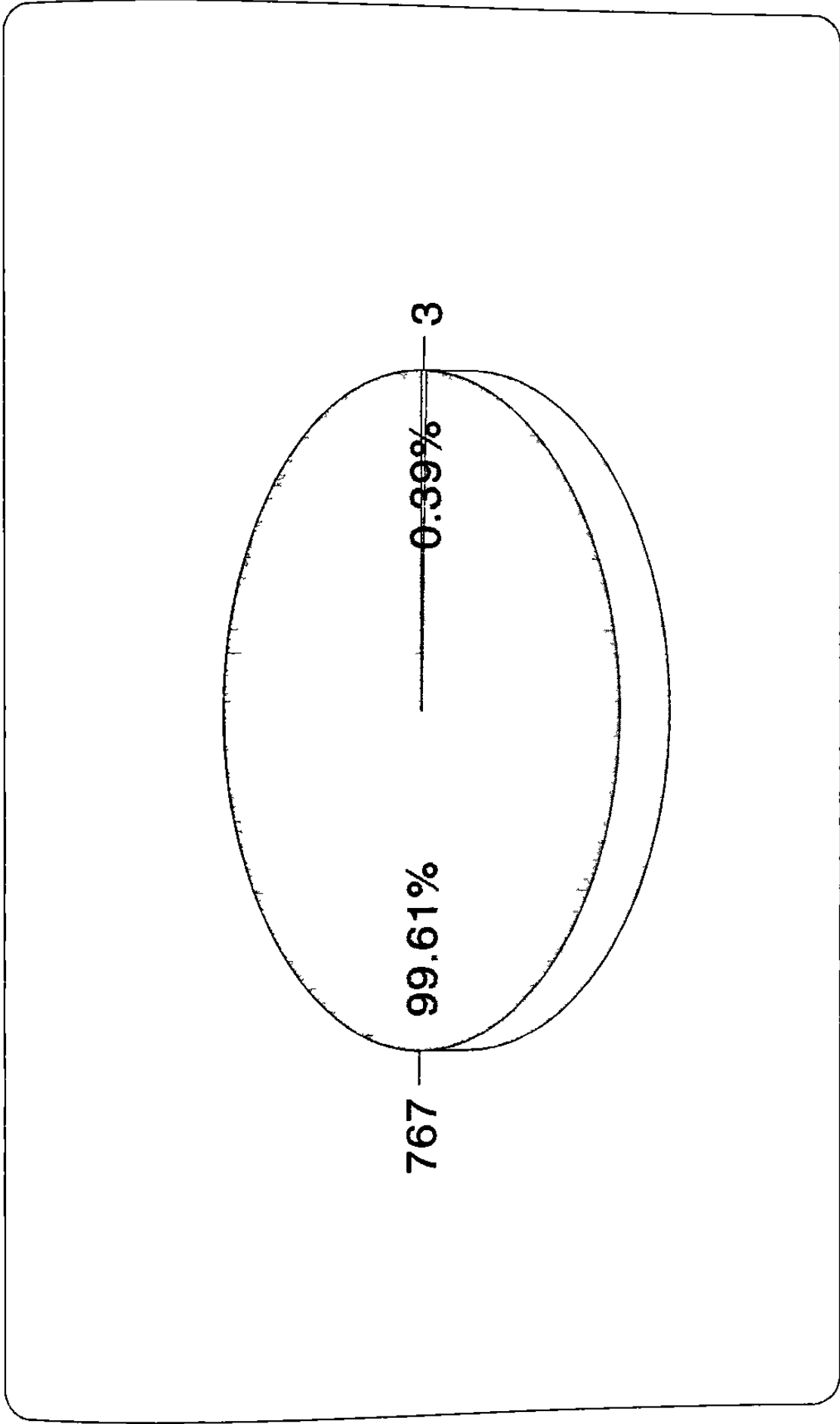
SEROPOSITIVOS SERONEGATIVOS

FIGURA 18. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE FAMILIARES DE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS.



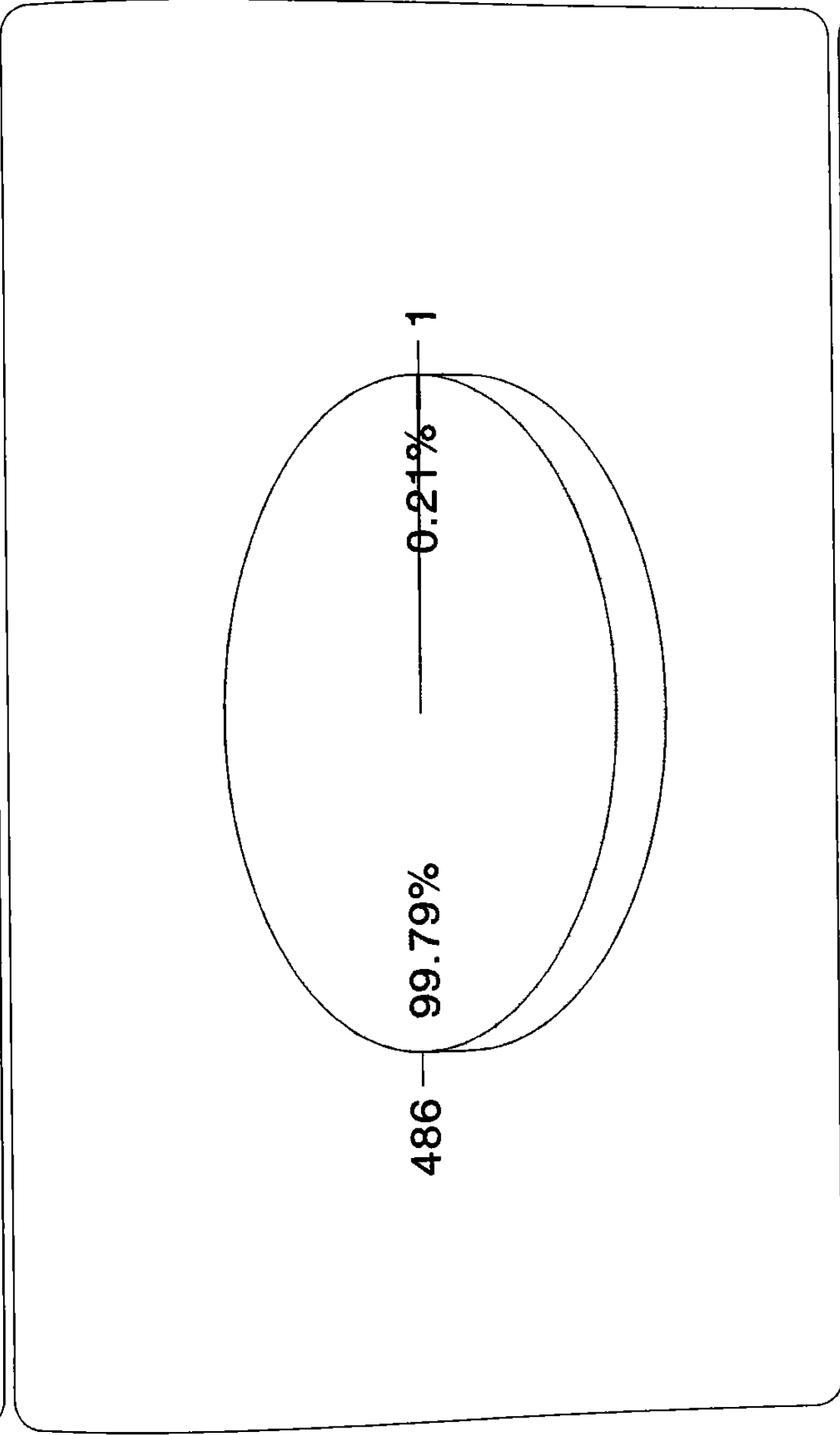
□ SEROPOSITIVOS ▨ SERONEGATIVOS

FIGURA 19. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE INDIVIDUOS DEL GRUPO CONTROL.



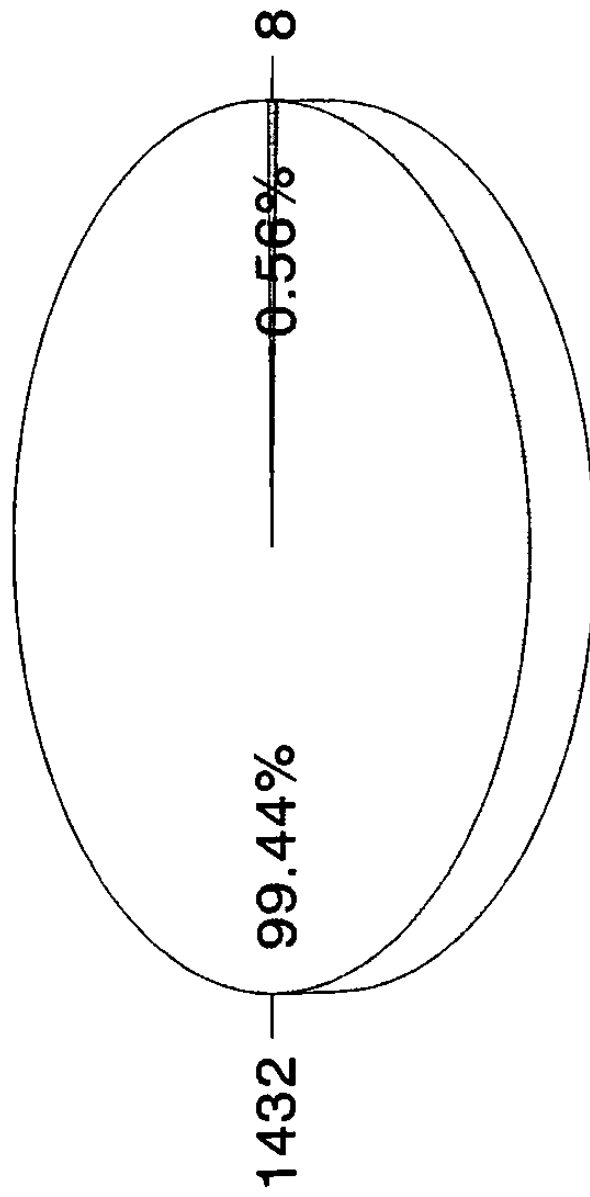
■ SERONEGATIVOS □ SEROPOSITIVOS

FIGURA 20. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE AMERINDIOS AMAZONICOS.



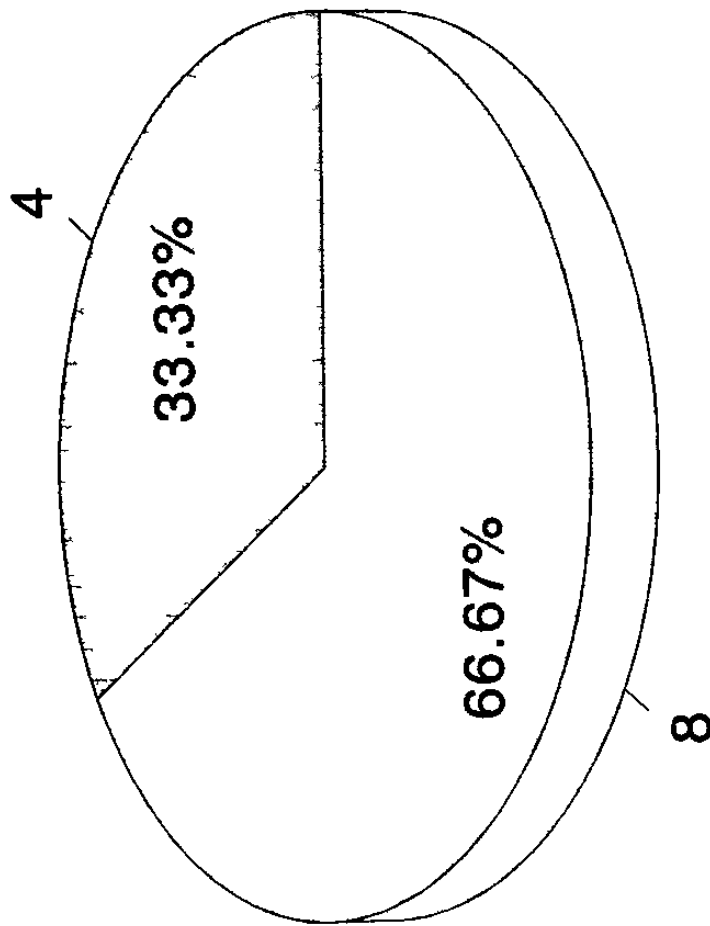
■ SEROPositivos □ SERONEGATIVOS

FIGURA 21. FRECUENCIA DEL HTLV-I ENTRE INDIVIDUOS NORMALES.



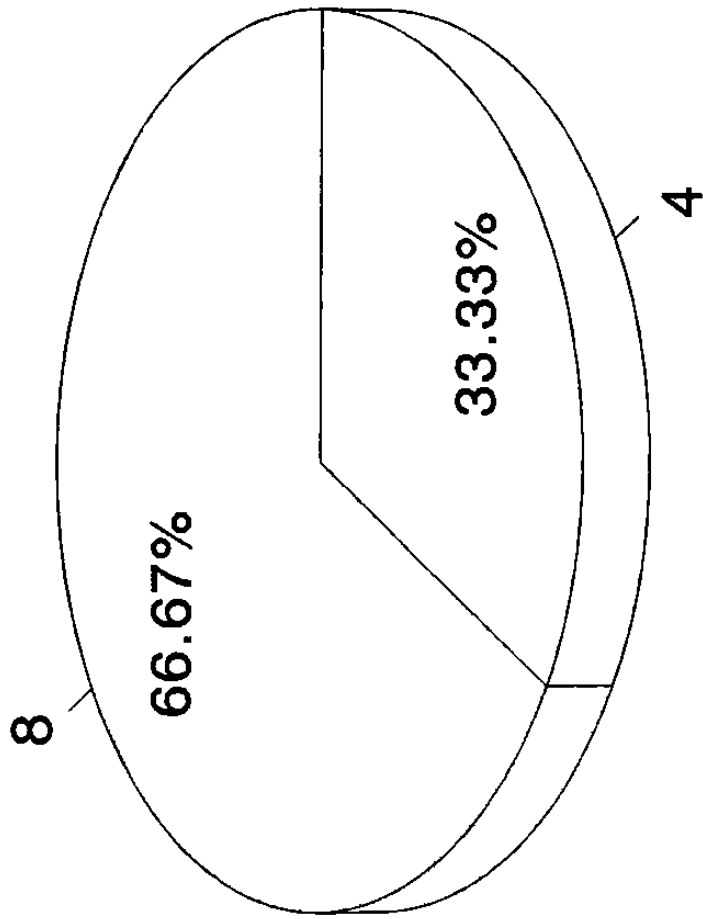
SERONEGATIVOS SEROPOSITIVOS

FIGURA 22. TRANSFUSION DE SANGRE Y HEMODERIVADOS ENTRE INDIVIDUOS HTLV-1 SEROPOSITIVOS.



TRANSFUNDIDOS NO TRANSFUNDIDOS

FIGURA 23. EXPOSICION A LA RADIATIVIDAD ENTRE INDIVIDUOS HTLV-I SEROPOSITIVOS.



CON RADIACION SIN RADIACION

10. Bibliografia.

1. Poiesz, B. J., F. M. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bum, J. D. Minna, R. C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7415-7419.
2. Imamura, J., A. Tsujimoto, Y. Ohta, S. Hirose, K. Shimotohno, M. Miwa, I. Miyoshi. 1988. DNA blotting analysis of human retroviruses in cerebrospinal fluid of spastic paraparesis patients: the viruses are identical to human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Int J Cancer* 42(2) 221-224.
3. Ishida, T., K. Yamamoto, K. Omoto, M. Iwanaga, T. Osato, Y. Hinuma. 1985. The prevalence of human retroviruses in native Japanese: evidence for a possible ancient origin. *J Inf Dis* 2:153-157.
4. Osame, M., M. Matsumoto, K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, M. Tara, A. Igata. 1987. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* 21:117-122.
5. Bartholomew, C., F. Cleghorn. 1989. Retrovirus in the Caribbean. *Bull Pan Am Health Organ* 23(1-2):76-80.
6. Saxinger, W., W. A. Blattner, P. H. Levine, J. Clark, R. Biggar, M. Hoh, J. Moghassi, P. Jacobs, L. Wilson, R. Jacobson. 1984. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. *Science* 225:1473-1476.

7. Nakauchi, C. M., A C. Linhares, K. Maruyama, L. I. Kanzaki, J. E. Macedo, V. N. Azevedo, J. S. R. Casseb. 1990. Prevalence of human T-cell leukemia virus I (HTLV-I) antibody among populations living in the Amazon region of Brazil (preliminary report). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **85**(1):29-33.

8. Asher, D. M., J. Goudsmit, K. L. Pomeroy. 1988. Antibodies to HTLV-I in populations of the Southwestern pacific. *J Med Virol* **26**:339-351.

9. Blayney, D. W., W. A. Blattner, M. Robert-Guroff, E. S. Jaffe, R. I. Fisher, P. A. Jr. Bunn, M G Patton, H R. Rarieck, R. C. Gallo, 1983. The human T-cell leukemia-lymphoma virus in the Southeastern United States. *JAMA* **250**:1048-1052.

10. Roman, G C., L. N Roman 1988. Tropical spastic paraparesis. A clinical study of 50 patients from Tumaco (Colombia) and review of the worldwide features of the syndrome. *J Neurol Sci* **87**(1):121-138.

11. Reeves, W., C., P. H. Levine, M. Cuevas, E. Quiroz, E. Maloney, W. C. Saxinger. 1990. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus in the Republic of Panama. *Am J Trop Med Hyg* **42**(4):374-379.

12. Yoshida, T., K. Yamamoto, K. Omoto. 1988. A seroepidemiological survey of HTLV-I in the Philipines *Int J Epidemiol* **17**(3):625-628.

13. Ishida, T., Y H. Pan, S. Horai, N. Saitou, C. S. Sun. 1993. Seroepidemiological survey of human T-lymphotropic retrovirus among indigenous populations in Taiwan. *Int J Epidemiol* **22**(5):927-930

14. Seniuta, N B , V. N. Stepin, V. E. Gurtserniech, V. S. Mazurin, L. S. Iakovleva. 1988 Antibodies to the human T-cell leukemia virus in the blood serum of the inhabitants of Sakhalin and Luzhno-Kuillsk. *Eksp Onkol* **10**(2):37-39.

- 15 Kalyanaraman, V S , M. G. Sarngadharan, I. Miyoshi, D. Blayney, D. Golde, R. C. Gallo 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**:571-573.
- 16.Hjelle, B., R. Mills, S. Suenson, G. Mertz, C. Key, S. Allen. 1990. Incidence of hairy cell leukemia, mycosis fungoides, and chronic lymphocytic leukemia in first known HTLV-II-endemic population *J Infect Dis* **163**:435-440.
- 17.Lairmore, M. D , S Jacobson, F. Gracia, B. K. De, L. Castillo, M. Larreategui, B. D. Roberts, P. H Levine, W A. Blattner, J. E. Kaplan. 1990. Isolation of a human T-cell lymphotropic virus type 2 from Guayami indians in Panama *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:8840-8844.
- 18.Boiron, M 1990 Viruses and malignant hemopathies. *Pathol Biol* **38**(1):57-63.
- 19 Luria, S. E , E D. James, A. Campbel. 1978. *General Virology*.. Tumor viruses, Chap 16, p 435-454 3rd ed. John Wiley & Sons. New York.
- 20.Levine, A. J 1988 Oncogenes of DNA tumor viruses. *Cancer Res* **48**:493-496.
- 21.Levy, J. A. 1986. The multifaceted retrovirus. *Cancer Res* **46**:5457-5468.
- 22 Henle, W. 1971. Evidence for a relation of the Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, p.361-425. In W. Nakayama, K. Nishioka, T. Hirayama, and Y Ito (ed). *Recent advances in human tumor virology and immunology*. Proceedings of the 1st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. University of Tokyo Press, Tokyo.

23. Durst, M., C. M. Croce, L. Gissmann, E. Schwarz, K. Huebner. 1987. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** 1070-1074
24. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Hepatitis viruses. 1994. Vol **59**, Lyon *World Health Organization*. p.39-41.
25. Bishop, J H 1987 The molecular genetics of cancer. *Science* **235**:305-311.
26. Gessain, A., R. C. Gallo, G. Franchini. 1992. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* **66**(4):2288-2295.
27. Kanzaki, L. I. B., S. Bernal, H. B. Souza, S. S. A. Monteiro, K. C. Silva, J. E. Macedo. R. Ishak 1990 Distribution of antibodies to HTLV-I among population groups of the Amazon, Brazil. *5th. Natl. Meet. Virol.* São Lourenço, MG, Brazil.
28. Rossi, G. B., S. Pulciani, M. Federico. 1986. Molecular biology of retroviruses In: *The molecular basis of viral replication*. Edited by Bercoff R. P. New York and London. p.355-413.
29. Epstein, M.A., B. G. Aschong. 1983. The relationship of the EBV virus to Burkitt's lymphoma. In: the Epstein-Barr virus, M. A. Epstein and B. G. Aschong, eds. Spring-Verlag, Berlin. p.322-327.
30. Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor virus. *Nature* **226** 1209-1211.
31. Temin, H. M., S. Mizutani, S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in Rous Sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-1213.

32. Hehlman, R., R. Brack-Werner, C. Leib-Mosch. 1988. Human endogenous retroviruses. *Leukemia* 2(12):1675-1775.
33. Mier, J. M., R. C. Gallo. 1980. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte conditioned medium *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6134.
34. Blattner, W. A. 1989. Retroviruses. Evans A S, de. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and control*. 3rd ed New York: Plenum Press, p.545-592.
35. Yamamoto, N., Y. Hinuma. 1988. Retroviridae: *Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I) Adult T-cell leukemia virus (ATLV)*. Chap.34, p. 663-676. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Principles and Practice*, vol II, Viral, Rickettsial and Chlamydial Diseases.
36. Greene, W. C., E. Bohnlein, D. W. Ballard. 1989. HIV-1, HTLV-1 and normal T-cell growth: transcriptional strategies and surprises. *Immunology Today* 10(8):272-278.
37. Lilienbaum, A., M. D. Dodon, C. Alexandre, L. Gazzolo, D. Paulin. 1990. Effect of human T-cell leukemia virus type I tax protein on activation of the human vimentin gene. *J Virol* 64 253-263.
38. Fox, H. B., P. D. Gutman, H. P. Dave, S. Y. Cao, M. Mittelman, P. E. Berg, A. N. Schechter. 1989. Transactivation of human globin genes by HTLV-I tax 1. *Blood* 74(8):2749-2754.
39. Shimotohno, K., Y. Takashi, N. Shimizu, T. Gojobori, D. W. Golde, I. S. Y. Chen, M. Miwa, T. Sugimura. 1985. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame from the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3101-3105.

40. Watanabe, T., M. Seiki, Y. Hirayama, M. Yoshida. 1986. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* 148:385-388.
41. Sherman, M. P., N. K. Saksena, S. K. Duke, R. Yanagihara, B. J. Poiesz. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J Virol* 66(4):2556-2563.
42. Hall, W. W., H. Takahashi, C. Liu, M. H. Kaplan, O. Scheewind, S. Ijichi, K. Nagashima, R. C. Gallo. 1992. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *J Virol* 66(4):2456-2463.
43. Sarkar, G., H-S. Yoon, S. S. Sommer. 1992. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucl Acids Res* 20(4). 871-878.
44. Ishizawa, M., Y. Kobayashi, T. Miyamura, S. Matsuura. 1991. Simple procedure of DNA isolation from human serum. *Nucl Acid Res* 19(20):5792.
45. Takatsuki, K., T. Uchiyama, J. Yodoy. 1977. Adult T-cell leukemia in Japan. In: *Topics in Hematology*, eds. S. Seno, F. Takaku and S. Irino (ed). Excerpta Medica, Amsterdam, p.73-77.
46. Jacobson, S., H. Shida, D. E. McFarlin, A. S. Fauci, S. Koenig. 1990. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348(6298):245-248.

47. Asou, N, T. Kumagai, S. Uekihara, M. Ishii, M. Sato, K. Sakai, H. Nishimura, K. Yamaguchi, K. Takatsuki. 1986. HTLV-I seroprevalence in patients with malignancy. *Cancer* **58** 903-907.
48. Blattner, W A., A. Nomura, J. W. Clark, G-Y. F. Ho, Y. Nakao, R. Gallo, M. Robert-Guroff. 1986. Modes of transmission and evidence for viral latency from studies of human T-cell lymphotropic virus type I in Japanese migrant populations in Hawaii. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** 4895-4898.
49. Miyamoto, Y., K. Yamaguchi, H. Nishimura, K. Takatsuki, T. Motoori, M. Morimatsu, T. Yasaka, I. Ohya, T. Koga. 1985. Familial adult T-cell leukemia. *Cancer* **55**:181-185.
50. Robert-Guroff, M., S. H. Weiss, J. A. Giron, A. M. Jennings, H. M. Ginzburg, I. B. Margolis, W. A. Blattner, R. C. Gallo 1986 Prevalence of antibodies to HTLV-I, -II, and -III in intravenous drug abusers from an AIDS endemic region. *JAMA* **255**:3133-3137.
51. Kohtz, D S, A. Altman, J. D Kohtz, S. Puszkin. 1988. Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoproteins and a region of human interleukin 2 implicated in binding the beta receptor *J Virol* **62**(2):659-662.
52. Mochizuki, S., K. Kawamura, K. Maruyama. 1986. Virus production and surface marker expression in human lymphocytes immortalized following dual infection with human T-cell leukemia virus and Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* **37**:551-556.
53. Sawada, M., A. Sugimura, M. Yoshida, T. Marunouchi. 1990. Human T-cell leukemia virus type I transactivator induces class I major histocompatibility complex antigen expression in glial cells *J Virol* **64**(8) 4002-4006.

54. Gessain, A., A. Louie, O. Gout, R. C. Gallo, G. Franchini. 1991. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Virol* **65**(3): 1628-1633.
55. Hinrichis, S. H., J. Vogel, M. J. Rhim, G. Jay. 1988. Use of transgenic animals to study human retroviruses. *Cancer Metastasis Rev* **7**(4):311-320.
56. Nakauchi, C. M., K. Maruyama, L. I. Kanzaki, A. C. Linhares, V. N. Azevedo, T. Fukushima, M. Miyauchi, N. Koshikawa, C. Tamayama, S. Mochizuki, K. Kawamura. 1992. Prevalence of HTLV-I antibody among two distinct ethnic groups inhabiting the Amazon region of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **34**(4):323-328.
57. Voltz, R., R. Hohlfeld. 1990. Multiple sclerosis and retroviruses. *Dtsch Med Wochenschr* **115**(11):432-434.
58. Hollsberg, P., A. Miller-Larsen, F. Skon Pedersen, J. Justesen, H. J. Hansen, S. Haar. 1989. Search for a retrovirus in long term cultured cerebrospinal fluid cells and peripheral blood mononuclear from patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* **80**(6):603-609.
59. Rdahl, E. 1989. Retroviruses and chronic arthritis. Possible significance of some recent observations. *Scand J Rheumatol* **18**(6):335-339.
60. Rubins, A., Y., H. M. Weksler. 1989. Viral-immunological pathogenesis of psoriasis. *Acta Derm Venereol (suppl)* **146**:214-215.
61. Waksman, B. H. 1989. Multiple sclerosis. Relationship to a retrovirus? *Nature* **337**(6208):599.

62. Nakauchi, C. M., A. C. Linhares, M. L. C. Gomes, K. Maruyama, L. Y. Kanzaki, V. N. Azevedo. 1991. Antibody to human T-lymphotropic virus in a patient with Guillain-Barré syndrome (case report) *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33(4): 329-331.
63. Merelli, E., P. Sala, G. Montagnani, E. Baladin. 1988. Absence of antibodies to HTLV-I and HIV in serum and cerebrospinal fluid of Italian patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 84(2-3) 337-339.
64. Koike, F., G. Palffy, T. Kunishita, M. Yoshida, T. Tabira. 1988. Absence of antibodies to HTLV-I in sera from Hungarian MS patients. *Acta Neurol Scand* 78(3):177-180.
65. Green, J. E., S. H. Hinrichs, J. Vogel, G. Jay. 1989. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-I tax transgenic mice. *Nature* 341:72-74.
66. Bangham, C. R., M. S. Nightingale, J. K. Cruickshank, S. Daenhe (technical comment). 1989. PCR analysis of DNA from multiple sclerosis patients for the presence of HTLV-I. *Science* 246(4931):821-824.
67. Evans, B. K., I. Gore, L. E. Harrel, T. Arnold, S. J. Oh. 1989. HTLV-I associated myelopathy and polymyositis in a US native. *Neurology* 39(12):1572-1575.
68. Reddy, E. P., M. Sandberg-Wollheim, R. V. Mettus, P. E. Ray, E. DeFreitas, H. Koprowski. 1989. Amplification and molecular cloning of HTLV-I sequences from DNA of multiple sclerosis patients. *Science* 243:529-533.
69. Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, C. Geny, C. M. Mallaret, E. Schuller, P. Stoebner, J. M. Seigneurin. 1991. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337 (8745):862-863.

70. Haahr, S., M. Sommerlund, A. Morller-Larsen, R. Nielsen, J. H. Hansen. 1991. Just another dubious virus in cells from a patient with multiple sclerosis? *Lancet* **337** (8745):863-864.
71. Flavel, R. A., H. Allen, L. C. Burkly, D. H. Sherman, G. L. Waneck, G. Widera. 1986. Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* **233**:437-44
72. Schwartz, B. D. The human major histocompatibility HLA complex. In: *Basic & Clinical Immunology*. Edited by Stites, D. P. et al. Lange Medical Publications, California, U.S.A. p.52-64.
73. Usuku, K., S. Sonoda, M. Osame. 1988. HLA haplotype-linked high immunoresponsiveness against HTLV-I in HTLV-I associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann Neurol* **23** (suppl):s143-s150.
74. Uno, H., K. Kawano, H. Matsuoka, K. Tsuda. 1988. HLA and adult T-cell leukaemia: HLA-linked genes controlling susceptibility to human T cell leukaemia virus type I. *Clin Exp Immunol* **71** (2):211-216.
75. Plaeger-Marshall, S., A. Haas, L. Clement, J. V. Giorgi, I. S. Chen, S. G. Quan, R. A. Gatti, E. R. Stiemh. 1988. Interferon induced expression of class II major histocompatibility antigens in the major histocompatibility complex (MHC) class II deficiency syndrome. *J Clin Immunol* **8**(4):285-295.
76. Nowwell, P., J. B. Finam, J. W. Clark, P. S. Sarin, R. C. Gallo. 1984. Karyotypic differences between primary cultures and cell lines from tumors with the human T-cell leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* **73**:849-852.

77. Maruyama, K., T. Fukushima, K. Kawamura, S. Mochizuki. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T lymphotropic virus type I. *Cancer Res (suppl)* 50:5697s-5720s.
78. Croce, C M 1986 Chromosome translocations and human cancer. *Cancer Res* 46:6019-6023
79. Ikeda, M, R. Fujino, F Matsui, T. Yoshida, H. Komoda, T. Imai. 1984. A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. *Gann* 75:845-848.
80. Saxinger, C., R. C. Gallo. 1983. Methods in laboratory investigation. Application of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay microtest to the detection and surveillance of human T-cell leukemia-lymphoma virus. *Lab Invest* 49:371-377.
81. Public Health Service Working Group. 1988. Licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. *Morbidity Mortality Weekly Rep* 37(48):736-745.
82. Maruyama K., T. Fukushima, S. Mochizuki, K. Kawamura, M. Miyauchi. 1992. Human T-cell leukemia virus type I as agent inducing genetic changes in infected human lymphocytes *Leukemia* 6 (suppl 3): 60s-63s.
83. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Snisky, T. J. White. 1990. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus. Chapter 39. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Acad Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. New York. p.325-336.

84. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci* 86:2766-2770.
85. Kecka, W. R. 1975 Discriminant analysis In: *SPSS, Statistical Package for the Social Sciences*, 2nd Ed. N. H. Nie, C. Hadlai Hull, J. G. Jenkins, K. Steinbrenner & D. H. Bent (eds), McGraw-Hill, New York. p.434-467.
86. Ando, Y., H. Hashimoto, K. Kakimoto, T. Tanigawa, I. Moriyama, M. Ichijo. 1990. p24 protein of a human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) producing cell line (TCL-Kan) reacts with some normal pregnant women's sera. *Acta Obst Gynae Jpn* 212(9):1251-1255.
87. Sato, A., Y. Isaka, F. Morita, A. Ishii, Y. Goto, J. Imai, H. Igarashi, O. Yoshie, Y. Hinuma 1992. Human sera from varicella-zoster virus (VZV) infections cross-react with human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-I p19 gag protein. *J Gen Virol* 73:2969-2973.
88. White, P. M. B. 1988 Comparison of assays for antibody to HTLV-I. *J Clin Pathol* 41:700-702.
89. Maruyama, K. comunicación personal.
90. Murphy, E. L., J. P. Figueroa, W. N. Gibbs, M. Holding-Cobhans, B. Cranston, K. Malley, A. J. Bodney, S. S. Alexander, W. A. Blattner. 1991. Human T-lymphotropic virus type I seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol* 133(11):1114-1124.

91. McLaughlin, G L., M. J. Benedik, G. H. Campbell. 1987. Repeated immunogenic amino acid sequences of Plasmodium species share sequence homologies with proteins from humans and human viruses. *Am J Trop Med Hyg* 37(2):258-262.
92. Black, F L., R. Y. Biggar, J. V. Neel, E M. Maloney, D. J. Waters. 1994. Endemic transmission of HTLV type II among Kayapo indians of Brasil. *AIDS Res Hum Retrovirus* 10(9) 1165-1171
93. Sanders, R. C., A. Levin, G. Anian, I. Webber, H. Lee, P. Swanson, A. Diwan, R. Desowitz, W A. Blattner, M. P Alpers. 1990. HTLV-I antibody studies in villagers in East Sepik Province, Papua New Guinea. *Arch Virol* 114:27-35.
94. Banki, K., J. Macedo, E. Hurley, E. Ablonczy, D. H. Mattson, L. Szegedy, C. Hung. 1992. 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 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1939-1943.
95. Andrade-Serpa, M J., J. A. Dobbin, P. Gomes, D. Linhares, J. G. Azevedo, J. Hendriks, S. A. Clayden, V. M. Rumjanek, R. S. Tedder. 1988. Incidence of retroviruses in some brazilian groups. *Immunol Lett* 18:15-18.
96. Rodriguez, L , F. Sinangil, G Godoy, S. Dewhurst, F. Merino, D. J. Volsky. 1985. Antibodies to HTLV-III/LAV among aboriginal amazonian indians in Venezuela. *Lancet* ii:1098-1100.
97. Lal, R. B, M. Povoas, A. A. Lal. 1992. Seroprevalence of HTLV-II in Paragominas, state of Para, Brazil *J A.I.D.S.* 5(6) 634-636.

98. Chen, Y. M., T. H. Lee, S. Z. Wiktor, G. M. Shaw, E. L. Murphy, W. A. Blattner, M. Essex. 1990. Type specific antigens for serological discrimination of HTLV-I and HTLV-II infection *Lancet* 336(8724):1153-1155.
99. Azevedo, V N, J Kayano, M. O G. Ishak, Hanington, W., R. Ishak. 1993. Prevalencia de Anticorpos anti-HTLV em indios da Amazonia brasileira. *Virologica* 93. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
100. Andrade-Serpa, M J., J. Tosswill, D. Schor, D. Linhares, J. Dobbin, M. S. Pereira. 1989. Seroepidemiologic survey for antibodies to human retroviruses in human and non-human primates in Brazil. *Int J Cancer* 44:389-393.
101. Linhares, M I. S. Comunicación personal.
102. Kitagawa, T., M. Fujishita, H. Taguchi, I. Miyoshi, H. Tadokoro. 1986. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA* 256:2342.
103. Tsugane, S., S. Watanabe, H. Sugimura, T. Otsu, K. Tobinai, M. Shimoyama, S. Nanri, H. Ishii. 1988. Infection states of human T lymphotropic virus type I and Hepatitis B virus among Japanese immigrants in the Republic of Bolivia. *Am J Epidemiol* 128(5) 1153-1161
104. Cortes, E., R. Detels, D. Abouafia, X. L. Li, T. Mondgil, M. Alan, C. Borrecker, A. Gonzaga, L. Oyafuso, M. Tondo, C. Boite, N. Hammershlag, C. Capitani, D. J. Slamon, D. D. Ho. 1989. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. *N Engl J Med* 320 (15):953-958.

105. Caterino-de-Araujo, A., J. S. Casseb, R. Neitzert, M. L. X. de Souza, F. Macumano, A. Del Mistro, A. De Rossi, L. Chieco-Bianchi. 1993. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-I seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Virologica* 93. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
106. Hayes, C. G., J. P. Burans, R. B. Oberst. 1991. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in a population from the Philippines: Evidence of cross-reactivity with *Plasmodium falciparum*. *J Inf Dis* 163 257-262.
107. Biggar, R. J., P. L. Gigase, M. Melbye, L. Kestens, P. S. Sarin, A. J. Bodner, P. Densets, W. J. Stevens, L. Pal C. Delacollete, W. A. Blattner. 1985. ELISA HTLV retrovirus antibody reactivity associated with malaria and immune complexes in healthy africans. *Lancet* 2 520-523.
108. Scientific Group on HTLV-I infection and associated diseases. *Regional Office for the Western Pacific of the World Health Organization*. 1988. Kagoshima, Japan.
109. Ridet, P. R., J. C. Artus, A. Capron. 1992. La deteccipn de la IgA para diagnosticar las infecciones retroviricas en el Caribe. *Bol Of Sanit Panam* 112(1):12-17.
110. Fang, C. T., A. E. Williams, S. G. Sandler, D. J. Slamon, B. J. Poiesz. 1988. Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type Y (HTLV-I). *Transfusion* 28 179-183.
111. Lee, H. H., W. C. Sherwood, D. E. Smith. 1990. HTLV-I and HTLV-II infection in U.S. blood donors is associated with differrent risk factors. *Proc 3rd Annual Retroviral Congress*. Hawaii

112. Flores Castañeda M. S., L. M. Trejo Avila, M. C. Salinas Carmona, C. Leal Gonzalez, A. Rodrigues Yapez. 1992. Anticuerpos anti-virus linfotrópicos de células T humanas, en sujetos de alto riesgo para la infección de VIH, en Monterrey. *Rev Inv Clinica* 44:37-42.
113. Zaninovic, V. 1986. Spastic Paraparesis: a possible sexually transmitted viral myeloneuropathy *Lancet* ii:697-698.
114. Schull, W. J., K. M. Weiss. 1992. Radiation carcinogenesis in humans, *Adv Radiat Biol* 16:215-258.
115. Reeves, W. C., C. Saxinger, M. M. Breeves, E. Quiroz, J. W. Clark, M. W. Hoh, W. A. Blattner. 1988. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroepidemiology and risk factors in metropolitan Panama. *Am J Epidemiol* 127(3):532-539.
116. Maruyama, K., M. Miyauchi, T. Fukushima, S. Mochizuki, N. Koshikawa, K. Kawamura, C. Tamayama, M. Nakano, A. Odo, S. Iha. 1989. Antigenic variations of retrovirus in japanese cancer patients. *Leukemia* 3 277-281.
117. Saraiva, J. C P Comunicación personal.
118. De Oliveira, M. S. P., E. Matutes, L. C. Famadas, T. F. Schulz, M. L. Calabro, M. Nucci, M. J. Andrade-Serpa, R. S. Tedder, R. A. Weiss, D. Catovsky. 1990. Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. *Lancet* 336 987-990
119. Vilmer, E, F Le Deist, A. Fischer, C. Guscelli, C. Nezelof, Y. De Prost, M. Prieur. 1985 Smouldering T lymphoma related to HTLV-I in a sicilian child. *Lancet* ii:1301.

120. Su, I. J., C. H. Wang, A. L. Cheng, Y. C. Chen, H. C. Hsieh, C. J. Chen, H. F. Tien, T. Woei, S. S. Wang, C. Y. Hu. 1988. Characterization of the spectrum of post thymic T-cell malignancies in Taiwan. A clinicopathologic study of HTLV-I positive and HTLV-I-negative cases. *Cancer* 61(10):2060-2070.
121. Clark, J. W., C. Gurgio, G. Franchini, W. N. Gibbs, W. Loftis, C. Newland, D. Mann, C. Saxinger, R. C. Gallo, W. A. Blattner. 1988. Molecular epidemiology of HTLV-I-associated non-Hodgkin's lymphomas in Jamaica. *Cancer* 61(7):1477-1482.
122. Saito, S., K. Furuki, Y. Ando, T. Tanigawa, K. Kakimoto, Y. Moriyama, M. Ichijo. 1989. Identification of HTLV-I sequence in cord blood mononuclear cells of neonates born to HTLV-I antigen-antibody positive mothers by polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 81:890-895.

ENCUADERNACIONES MODERNAS

DIEGO DE MONTEMAYOR 638 NTE.

CRUZ CON TREVIÑO

TEL. 374-02-59

CENTRO DE COPIADO

