



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**VIRUS LINFOTROPICO T HUMANO TIPO 1 y 2 (HTLV-1/2) EN  
ARGENTINA: FRECUENCIA DE INFECCIONES Y ENFERMEDADES  
ASOCIADAS EN UN CENTRO DE REFERENCIA DE BUENOS  
AIRES, GENOTIPOS CIRCULANTES Y FACTORES GENETICOS**

Tesis presentada para optar al título de  
Magister en Biología Molecular Médica

**Bioq. Sindy Anna Fraile González**

Director de tesis  
**Dra. Mirna M. Biglione**

Director asistente  
**Dra. Carolina A. Berini**

Lugar de Trabajo  
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)  
UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

**AÑO 2016**

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. **Horacio Salomón**, Director del INBIRS, por haberme permitido la realización de mi tesis en el Instituto, brindarme los recursos y herramientas necesarias para el desarrollo de la misma.*

*Al **INBIRS** por ofrecerme las condiciones favorables para realizar este trabajo.*

*Al grupo de **Consulta Externa** por la calidad en la atención a pacientes.*

*A la **Dra Mirna Biglione** por haberme aceptado como integrante del grupo, por su preocupación por mi diario vivir, valiosos consejos, correcciones, confianza y brindarme todos los recursos para el desarrollo de éste trabajo.*

*A la **Dra Carolina Berini** y familia por su inmensa colaboración, calidez, consejos, dedicación, por contagiarme de su energía positiva, por su disposición a ayudarme en lo que necesitara, apoyo incondicional y motivación.*

*A **Camila, Jimena, Gaby, Ceci y Matías** por sus contribuciones, calidez y palabras de aliento.*

*A **Andrea** y **Lucas** por su invaluable colaboración en la secuenciación.*

*A **Sergio** por el cariño e incentivo en culminar este proyecto, ser mi punto de equilibrio y mi compañía al estar lejos de casa.*

*A **Carolina** y **Juan** por abrirme las puertas de su casa, por su confianza, cariño y energía positiva.*

*A mis amigos entrañables de toda la vida que me han motivado y brindado su incondicionalidad en los buenos y malos momentos de mi vida.*

*A Todos y cada una de las personas que he conocido en este hermoso país, por abrirme las puertas de su casa y ser mi red de apoyo en el extranjero.*

*A mis ángeles que aunque no los veo físicamente, sé que siempre han estado en mi vida y me permiten seguir creciendo espiritualmente.*

*A las manitos de Dios por guiarme en este camino.*

*A Dios por ser el motor de mi existencia, por darme las herramientas celestiales necesarias en mi diario vivir y por rodearme de sus ángeles en la tierra.*

*A mis padres, José y Elena, mis hermanos, sobrinos y a toda mi familia por su amor inmenso, y su apoyo incondicional desde el primer instante en que comencé este proyecto. Los amo*

## **VIRUS LINFOTROPICO T HUMANO TIPO 1 y 2 (HTLV-1/2) EN ARGENTINA: FRECUENCIA DE INFECCIONES Y ENFERMEDADES ASOCIADAS EN UN CENTRO DE REFERENCIA DE BUENOS AIRES, GENOTIPOS CIRCULANTES Y FACTORES GENETICOS**

Se estima que de 15 a 20 millones de personas están infectadas con el HTLV-1 y de 3 a 5 millones con el HTLV- 2 en el mundo. Para ambos virus existen áreas endémicas con comunidades de originarios naturalmente infectados por uno de los tipos virales. La mayoría de ellos permanecen asintomáticos durante toda la vida y solo entre el 3 y 5% desarrolla una de las dos patologías asociadas al HTLV-1, la Leucemia a Células T del Adulto o la Mielopatía asociada al HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical. Es por ello, que el riesgo de desarrollar o no la enfermedad estaría influenciado por otros factores, ya sea virales, del medioambiente o del huésped.

El objetivo principal de esta tesis fue aportar mayores conocimientos sobre el HTLV 1 y 2 en Argentina, a través de un análisis descriptivo de los casos estudiados por el Grupo HTLV de Medicina Traslacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), de las cepas circulantes y mediante la identificación de polimorfismos específicos de HLA relacionados con el desarrollo o ausencia de patologías asociadas al HTLV-1.

Si bien nuestro país es endémico para el HTLV-1 en el Noroeste (Jujuy y Salta) y para el HTLV-2 en la Región Chaqueña (Chaco y Formosa), este trabajo de tesis confirma que ambos virus circulan en todas las provincias del país y que ambos son detectados en poblaciones no vulnerables como puede ser la de donantes de sangre. Deja establecido que una confirmación molecular y la necesidad de contar con laboratorios de referencia a nivel nacional es muchas veces necesaria para llegar a un diagnóstico definitivo.

Los estudios filogenéticos identificaron únicamente al subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental (Aa) del HTLV-1 en casos con patología y confirmaron nuevamente a este subtipo como mayoritario en el país. En base a los antecedentes epidemiológicos, se infiere que estas cepas podrían haber sido introducidas en la población caucásica de áreas no endémicas tiempo atrás a partir de ascendientes originarios, o bien por contacto con individuos infectados o de áreas endémicas, como Perú, para estos retrovirus.

Se describen las características epidemiológicas de casos de ATLL y HAM/TSP, los niveles de carga proviral asociados a ellas y por primera vez se identifican alelos reportados como susceptibles para las patologías asociadas, como el HLA-A\*33, previamente descrito como protector en Jamaica.

Los datos de esta tesis brindan datos concretos sobre la necesidad de incluir a estos retrovirus en un programa nacional del ámbito de la Salud Pública, con el fin de implementar medidas de vigilancia que considere la capacitación de profesionales para realizar su diagnóstico y brindar la información necesaria en relación a la atención primaria y seguimiento de pacientes.

**Palabras clave:** HTLV-1/2, EPIDEMIOLOGÍA, FILOGENIA, ATLL, HAM/TSP, CARGA PROVIRAL, HLA, ARGENTINA.

## ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATLL</b>	Leucemia Linfoma a Células T del Adulto/ <i>Adult T-cell Leukemia Lymphoma</i>
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CMSP/PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica/ <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>CREB</b>	Elemento de unión en respuesta al AMPcíclico/ <i>cAMP Response element binding</i>
<b>env</b>	gen codificante de proteínas de envoltura virales
<b>gag</b>	gen codificante de proteínas de cápside Gag virales
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias granulocítico-macrófagos/ <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>GLUT-1</b>	Transportador de glucosa 1
<b>HAM/TSP</b>	Mielopatía asociada al HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical/ <i>HTLV-1 associated myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis</i>
<b>HBZ</b>	Cierre básico de leucinas de HTLV-1/ <i>HTLV-1 Basic Leucine Zipper</i>
<b>HIV</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana/ <i>Human immunodeficiency virus</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano/ <i>Human leukocyte antigen</i>
<b>HSPGs</b>	Proteoglicanos de Heparán sulfato/ <i>Heparan sulphate proteoglicans</i>
<b>HDAC-1</b>	Histona deacetilasa/ <i>Histone deacetylase 1</i>
<b>HMT</b>	Histona Metilasa/ <i>Histone metilase</i>
<b>HTLV</b>	Virus Linfotrópico T Humano/ <i>Human T cell Lymphotropic Virus</i>
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1/ <i>Intracellular adhesion molecule 1</i>
<b>IL-2</b>	Interleuquina 2
<b>LAV</b>	Linfoadenopatía asociada a virus/ <i>Lymphadenopathy Associated Virus</i>
<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a la función de linfocito/ <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>LOD</b>	Límite de detección/ <i>Limit of detection</i>
<b>LTR</b>	Repeticiones terminales largas/ <i>Long terminal repeats</i>
<b>MA</b>	Proteína de matriz

<b>MIQE</b>	Información mínima para la publicación de experimentos en PCR en tiempo real/ <i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
<b>MTOC</b>	Centro organizador de Microtúbulos/ <i>Microtubule-organizing center</i>
<b>NfκB</b>	Factor nuclear Kappa B/ <i>Nuclear factor Kappa B</i>
<b>NK</b>	Células asesinas naturales/ <i>Natural killer cells</i>
<b>NP</b>	Nucleoproteína
<b>NRP-1</b>	Neuropilina-1
<b>ORFs</b>	Marcos abiertos de lectura/ <i>Open Reading Frame</i>
<b>PNH</b>	Primates no humanos
<b>PTLVs</b>	Virus Linfotrópico T de Primates/ <i>Primate T cell Lymphotropic Virus</i>
<b>Rex</b>	Regulador de la expresión de la región X/ <i>Regulator of expression from X region</i>
<b>RRE</b>	Elemento de respuesta a Rex/ <i>Rex responsive element</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
<b>STLVs</b>	Virus Linfotrópico T Simianos/ <i>Simian Lymphotropic T Cell Virus</i>
<b>Tax</b>	Transactivador de la región X/ <i>Transactivator from X</i>
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento tumoral β/ <i>Tumor growth factor-β</i>
<b>TRE</b>	Elementos de respuesta a Tax/ <i>Tax responsive elements</i>
<b>UDI</b>	Usuario de drogas inyectables
<b>VRS</b>	Virus del Sarcoma de Rous

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>HISTORIA</b>	14
<b>CLASIFICACIÓN</b>	16
<b>ESTRUCTURAL VIRAL</b>	17
<b>Organización genómica, expresión y funciones biológicas del HTLV-1</b>	18
Secuencias LTR	19
Región pX	21
Proteína TAX	22
Factor de transcripción HBZ	24
Proteína REX	25
Proteína P27rex	25
Proteína p12'	25
<b>Organización genómica del HTLV-2</b>	26
<b>CICLO BIOLÓGICO Y VARIABILIDAD GENÓMICA DE LOS HTLVs</b>	26
<b>REPLICACIÓN DEL HTLV</b>	29
Virofilms o ensamblajes extracelulares tipo Biofilm	29
Sinapsis Viral	29
Conductos celulares	30
<b>VIAS DE TRANSMISIÓN DE LOS VIRUS HTLVs</b>	31
Transmisión Madre a Hijo (TMH)	31
Transmisión Sexual	33
Transmisión Parenteral	33
Transmisión por Trasplante	33
<b>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL HTLV-1/2</b>	33
<b>FILOGENIA DEL HTLV-1/2</b>	35
<b>PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL HTLV-1</b>	36
Mielopatía asociada al HTLV-1/Paraparesis Espástica Tropical (HAM/TSP)	36
Leucemia/Linfoma a Células T del Adulto (ATLL)	37
<b>FACTORES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA PATOLOGÍA</b>	38
Vía de infección primaria	39
Carga proviral	39
Factores genéticos del huésped	39

<b>HLA E INFECCIÓN POR HTLV-1/2</b>	42
<b>SITUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR HTLV-1/2 EN ARGENTINA</b>	44
<b>DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HTLV 1/2</b>	45
<b>OBJETIVOS</b>	48
Objetivo general	48
Objetivos específicos	48
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	49
<b>Tipo de estudio</b>	50
<b>Población</b>	50
<b>Aspectos éticos</b>	51
<b>Tipo de muestra</b>	51
Plasma y sangre entera	51
Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	51
Extracción de ADN	52
<b>DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HTLV-1</b>	52
<b>DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO</b>	52
<b>Pruebas de tamizaje</b>	52
Aglutinación de partículas	52
ELISA	53
<b>Prueba confirmatoria</b>	53
Western Blot	53
<b>DIAGNÓSTICO MOLECULAR</b>	54
Carga proviral de HTLV	56
Secuenciación y análisis filogenético de la región LTR	57
Amplificación de los alelos HLA-A	59
Secuenciación de los alelos de HLA Clase I	59
<b>PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS</b>	59
Datos epidemiológicos de HTLV	59
Carga proviral	59
Análisis filogenético de HTLV-1	60
Tipificación de HLA-A	60
<b>RESULTADOS</b>	61

Características epidemio-demográficas de todos los casos procesados para diagnóstico de HTLV-1/2 por el grupo HTLV del INBIRS	62
Características demográficas	62
Frecuencia y características epidemiológicas de casos confirmados como HTLV-1 y HTLV-2 diagnosticados en el INBIRS	66
Prevalencia y características epidemiológicas de los casos con patologías asociadas al HTLV-1	70
Análisis filogenético las cepas HTLV-1 detectadas en individuos con patologías asociadas a la infección	72
Niveles de carga proviral de pacientes con patologías asociada al HTLV-1	76
Alelos de HLA relacionados con susceptibilidad y/o protección para HAM/TSP o ATLL en pacientes de Argentina	79
<b>DISCUSIÓN</b>	84
<b>CONCLUSIONES</b>	94
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	97

## INDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 1	Listado de alelos de HLA asociados al nivel de carga proviral y protección/susceptibilidad a las patologías asociadas al HTLV-1 reportados en estudios previos	41
Tabla 2	Listado de alelos asociados a susceptibilidad para la infección por HTLV-1/2 según el origen étnico	43
Tabla 3	Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de aglutinación de partículas	53
Tabla 4	Patrón de las bandas observadas en el Western Blot e interpretación de los resultados	54
Tabla 5	Pares de cebadores usados para la amplificación de un fragmento de <i>pol</i> y <i>tax</i> del HTLV-1 y HTLV-2	55
Tabla 6	Pares de cebadores usados para la amplificación de un fragmento del LTR del HTLV-1	58
Tabla 7	Condiciones de ciclado para la PCR de secuenciación para HTLV-1 a partir de un fragmento del LTR	58
Tabla 8	Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de HLA-A	59
Tabla 9	Características demográficas de la población estudiada	62
Tabla 10	Distribución por edad y género de casos procesados para diagnóstico de HTLV en el INBIRS	63
Tabla 11	Distribución por provincia de los casos procesados en el INBIRS para diagnóstico de HTLV-1/2	64
Tabla 12	Distribución por tipo de derivación de casos procesados en el INBIRS para diagnóstico de HTLV-1/2	69
Tabla 13	Datos demográficos y valores de carga proviral (CPV) para cada una de las muestras pertenecientes a pacientes con patologías asociadas a la infección por HTLV-1	77
Tabla 14	Parámetros estadísticos de los dos grupos de patologías asociados al HTLV-1	78
Tabla 15	Descripción de los valores de carga proviral (CPV) y polimorfismos de HLA-A de las muestras provenientes de individuos con patologías del INBIRS	79

Tabla 16	Descripción de las características epidemiológicas y los polimorfismos de HLA-A de las muestras provenientes de individuos asintomáticos con infección por HTLV-1	81
Tabla 17	Valores de carga proviral (N° copias de gen <i>pol</i> /100 células) distribuidos por alelos de HLA-A presentes en individuos con patologías asociadas al HTLV-1	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Árbol filogenético de la familia de PTLVs (Método Neighbor-joining) en base a 7075 pb de los genes <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i> y <i>tax</i> .	16
Figura 2	Estructura de la partícula viral de los HTLVs	17
Figura 3	Organización genómica del HTLV detallando TRE (Elementos de Respuesta a Tax) y la interacción entre el TRE-1 y complejo Tax/CREB/CBP/p300	21
Figura 4	Efectos de Tax y HBZ en la proliferación y persistencia viral en el huésped	24
Figura 5	Ciclo de replicación del HTLV-1	27
Figura 6	Mecanismos de transmisión célula a célula del HTLV-1	31
Figura 7	Transmisión e infección <i>de novo</i> por HTLV-1	32
Figura 8	Algoritmo diagnóstico de la infección por HTLV-1/2	46
Figura 9	Distribución por género	62
Figura 10	Distribución por edad y género	63
Figura 11	Distribución por motivo de diagnóstico de HTLV-1/2	65
Figura 12	Muestras recibidas en el INBIRS por año	67
Figura 13	Distribución por edad en relación al tipo de infección	67
Figura 14	Distribución de casos HTLV según el tipo de infección y el género	68
Figura 15	Variación del número de muestras de donantes de sangre recibidas en el INBIRS por año	69
Figura 16	Distribución por provincia de los casos infectados HTLV-1/2	70
Figura 17	Procedencia de los individuos con patologías asociadas al HTLV-1	71
Figura 18	Medianas de edad y género para individuos con ATLL Y HAM/TSP	72
Figura 19	Árbol de Neighbour Joining de un fragmento del LTR del HTLV-1	74
Figura 20	Curva de calibración con diluciones 1/10 de un cultivo de células MT-2 infectadas con HTLV-1	76
Figura 21	Valores de CPV para individuos con ATLL y HAM/TSP	78
Figura 22	Comparación de medianas de edad de individuos asintomáticos y diagnosticados con patologías asociadas a la infección por HTLV-1	80
Figura 23	Valores de carga proviral para los distintos alelos de HLA-A	82

# INTRODUCCIÓN

El Virus Linfotrópico T Humano tipo 1 (HTLV-1), primer oncoretrovirus humano descubierto en 1980, es el agente etiológico de la Leucemia/ Linfoma a Células T del Adulto (ATLL), la Mielopatía Asociada al HTLV-1 o Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), y otras patologías de tipo inflamatorias como la uveítis, dermatitis infecciosa, polimiositis, sinovitis, neumonitis bronqueoalveolar. Se estima que el HTLV-1 infecta entre 15 a 20 millones de personas en el mundo, y si bien la mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos durante toda su vida, del 1 al 5% de la población infectada desarrollará una de las dos enfermedades asociadas más frecuentes (HAM/TSP o ATLL) [1]. El riesgo de desarrollar alguna de ellas, estaría determinado por la vía de infección, la carga proviral, la eficacia de la respuesta inmune y factores genéticos del huésped que determinan la susceptibilidad o protección frente a la enfermedad [2, 3].

El Virus Linfotrópico T humano tipo 2 (HTLV-2); segundo oncoretrovirus humano descrito en 1982, comparte el 65% de homología con el HTLV-1 en su estructura genómica y propiedades biológicas [4]. Se estima que el HTLV-2 infecta de 3 a 5 millones de personas en el mundo y al igual que el HTLV-1 es endémico en diferentes regiones determinadas [5]. Si bien al HTLV-2 no se lo considera causante de una patología específica, se lo ha relacionado a síndromes neurológicos similares a la HAM/TSP y a un aumento en la incidencia de infecciones y mortalidad [5-7].

Los virus HTLV-3 y HTLV-4 fueron descubiertos en el año 2005. El HTLV-3 fue hallado en individuos procedentes de Camerún, del cual se han descrito cuatro cepas; y el HTLV-4 se aisló de un cazador de primates no humanos (PNH) de Camerún [8, 9]. Los pocos casos descritos hasta el momento para ambos virus se delimitan a poblaciones de África Central [10].

## **HISTORIA**

El virus del sarcoma de Rous (VRS), responsable del sarcoma de pollo, fue el primer retrovirus oncogénico descrito y descubierto por Peyton Rous en 1911 [11]. Décadas más tarde Temin y Baltimore, comprobarían la existencia de la transcriptasa reversa o ADN (ácido desoxiribonucleico) polimerasa ARN (ácido

ribonucleico)- dependiente (enzima capaz de sintetizar ADN a partir de ARN) codificada por el genoma del RSV, lo que permitiría comprender como un genoma viral a ARN es capaz de integrarse al genoma del huésped en forma de ADN [12].

En 1976 el hallazgo de la Interleuquina 2 (IL-2) permitiría mantener linfocitos humanos en cultivo por periodos más largos, y facilitaría el establecimiento de líneas celulares humanas [13, 14]. Un año más tarde, el grupo del Dr. Takatsuki describió un tipo de leucemia frecuente en Japón y sugería que un virus podría ser el agente causal de esta enfermedad, al observar producción de partículas virales en linfocitos de un paciente con ATLL [15, 16].

El virus **HTLV-1** fue descrito en 1980 por el Dr. Poiesz en Estados Unidos, quien aísla este primer retrovirus humano, a partir de una línea celular derivada de un paciente con ATLL [17]. Posteriormente Hinuma y colaboradores, demostraron en 1981 la presencia de anticuerpos anti-HTLV-1 en sueros provenientes de pacientes con ATLL [18].

Dos años después, el Dr. Kalyanaraman y colaboradores aíslan el **HTLV-2** a partir de células de un paciente norteamericano que padecía una leucemia atípica a células vellosas [19]. Un par de años más tarde, el mismo grupo realizó un segundo aislamiento a partir de otro paciente que padecía el mismo tipo de enfermedad hematológica [20].

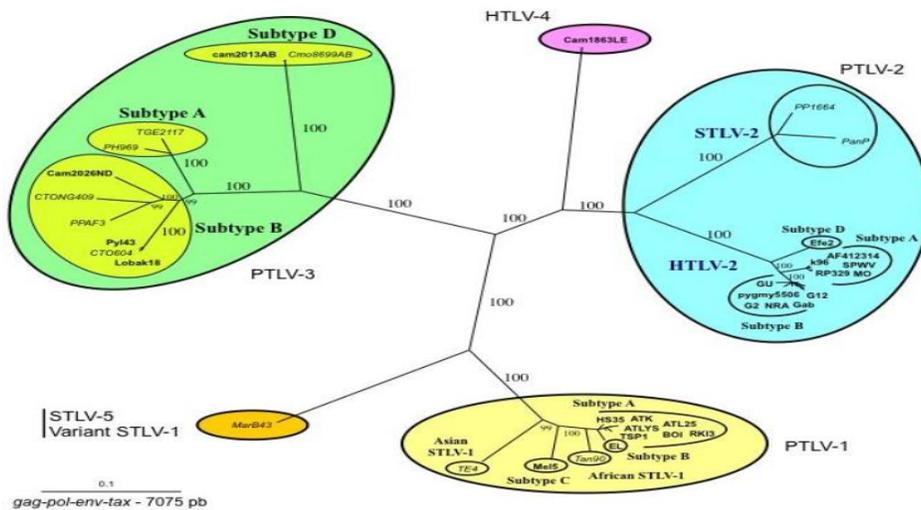
En 1984, simultáneamente en Francia y en Estados Unidos, los Investigadores Luc Montagnier y Robert Gallo identificaron un nuevo retrovirus, causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), denominado inicialmente como LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*) por el grupo francés y como HTLV-III por el grupo estadounidense. Finalmente, en 1986, el Comité Internacional de Taxonomía Viral reemplazó ambas denominaciones por el de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) [21].

Veinte años más tarde, en el 2005, los grupos del Dr. Gessain y del Dr. Switzer reportaron el descubrimiento del **HTLV-3** en individuos asintomáticos de Camerún. Además, el mismo año, Wolfe y colaboradores dieron a conocer la existencia de un cuarto tipo viral detectado en un individuo de Camerún, clasificándolo como **HTLV-4** [8, 9].

## CLASIFICACIÓN

Los retrovirus humanos HTLV se agrupan dentro de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, genero *Deltaretrovirus*, [22] y derivan filogenéticamente de los Virus Linfotrópicos T Simianos (STLV) [23].

Los HTLVs y STLVs se agrupan dentro de la familia de Virus Linfotrópicos T de Primates (PTLV), los cuales comparten una serie de características moleculares y epidemiológicas. Los virus HTLV-1 y STLV-1 conforman el grupo PTLV-1, el virus HTLV-2 y STLV-2 se encuentran dentro del grupo PTLV-2, el grupo PTLV-3 está constituido por los virus HTLV-3 y STLV-3, y por último el HTLV-4 y su homólogo simiano STLV-4 han sido aislados en la misma región africana que el HTLV-3 (Figura 1). Se ha encontrado que la cepa Mac B43 originada de *Macaca arctoides* es altamente divergente de STLV-1/HTLV-1 y es considerada por algunos autores como STLV-5 por su gran diversidad genética, aunque la mayoría aún la consideran un subtipo de STLV-1 [24].

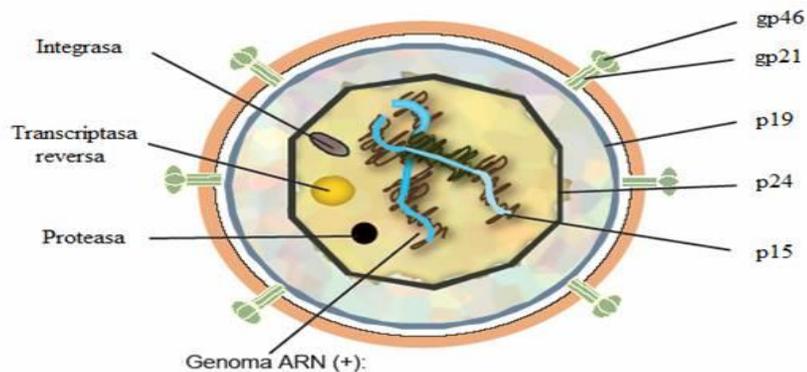


**Figura 1.** Árbol filogenético de la familia de **PTLVs** (Método Neighbor-joining) en base a 7075 pb de los genes *gag*, *pol*, *env* y *tax*. Las cepas humanas de HTLV-3 y HTLV-4 se indican en negrita.

*Adaptado de Mahieux et al., 2011.*

## ESTRUCTURA VIRAL

La partícula viral está formada por una nucleocapside icosaédrica de 110 a 140 nm de diámetro, envuelta por una membrana lipoproteica que contiene el genoma viral formado por ARN de simple cadena, encontrándose dos copias por cada partícula viral. El ADN proviral es sintetizado a partir de ARN viral por la enzima transcriptasa inversa produciendo ADN de doble cadena que luego es integrado al genoma del huésped [25]. En este estado el genoma viral es llamado "provirus" el cual puede permanecer como tal por varios años, hasta que en algún momento por razones aún no esclarecidas puede continuar su replicación y producir nuevas partículas virales. La transcripción del provirus es llevada a cabo por la maquinaria celular, la cual no es capaz de distinguir señales virales de las propias [25].



**Figura 2.** Estructura de la partícula viral de los HTLVs. *Adaptado de la tesis de Nicolás Larrosa*

En cuanto al componente proteico de origen viral, éste se halla representado por un multímero de dos glicoproteínas de envoltura: gp46 (externa o de superficie) y gp21 (de transmembrana). La primera es la que se adsorbe al receptor celular y tiene capacidad de producir la síntesis de anticuerpos neutralizantes en el huésped infectado. La segunda, mantiene al complejo gp21-00000gp46 en la superficie del virión y participaría en el proceso de fusión. Por dentro de la envoltura lipídica se encuentra la cápside externa, un poliedro de 60 caras triangulares, constituida por la proteína p19 conteniendo al *core* o núcleo viral, que se encuentra formado por una segunda cápside interna de proteína p24.

El *core* encierra el genoma (dos moléculas idénticas de ARN unidas a la nucleoproteína p15) junto con enzimas que resultan fundamentales para completar el ciclo viral. Entre ellas están la transcriptasa reversa con su actividad ADN polimerasa ARN dependiente-ribonucleasa H, cuya función es generar un ADN complementario (ADNc) y desintegrar la cadena de ARN; la integrasa, que permite la unión covalente del virus al ADN celular; y la proteasa que cliva las proteínas producto de los genes (Figura 2) [26].

### **Organización genómica, expresión y funciones biológicas del HTLV-1**

El genoma del HTLV contiene tres genes estructurales que codifican las proteínas virales de envoltura (*env*), cápside (*gag*) y polimerasas (*pol*), genes reguladores de la replicación viral y secuencias LTR (repeticiones terminales largas) en cada extremo (Figura 3). La traducción de las proteínas para las cuales codifican los tres genes *gag*, *pro* y *pol* se realiza a partir de un ARN mensajero (ARNm) que no sufre *splicing* formándose un polipéptido precursor de las tres proteínas de la nucleocápside (p19, p24 y p15), la proteasa y la transcriptasa reversa. La transcripción del provirus genera tres moléculas diferentes de ARNm. El ARN de mayor tamaño llamado ARN genómico del cual depende la síntesis de las proteínas virales que se derivan en los genes *gag* y *pol* y que puede ser utilizado para ser encapsidado dentro de las nuevas partículas virales o bien puede ser traducido para producir un precursor de 55pb. Superpuesto a estos genes se encuentra el gen *pro* que corresponde a un ORF (marco de lectura abierto) de 703 nucleótidos el cual codifica para la enzima proteasa (14 kDa) generada por procesos de autoclivado. El segundo ARNm codifica para el gen *env* del cual deriva un precursor de 61-69Kd, dependiendo el grado de glicosilación. Por último, un tercer ARNm codifica las proteínas regulatorias de la región pX: p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup>, p21<sup>Rex</sup>, HBZ (cierre básico de leucinas de HTLV-1), y otras proteínas accesorias como p12, p13, y p30 en el HTLV-1 y p10, p11 y p28 en el HTLV-2 [27].

Del mayor ARN genómico se genera un precursor de peso molecular de 55 Kd (p55), el cual es clivado por proteasas virales dando lugar a las proteínas de la

nucleocápside: p15, p19 y p24 que corresponden a la nucleoproteína (NP), proteína de matriz (MA) y la proteína de la cápside (CA), respectivamente. La p24 presenta el mayor porcentaje de identidad en su secuencia aminoacídica (85 a 91,6%) entre los HTLV-1, 2, 3 y 4, y es la responsable de la inmuno-reactividad cruzada para los antígenos p24 que se observa en estos virus [28].

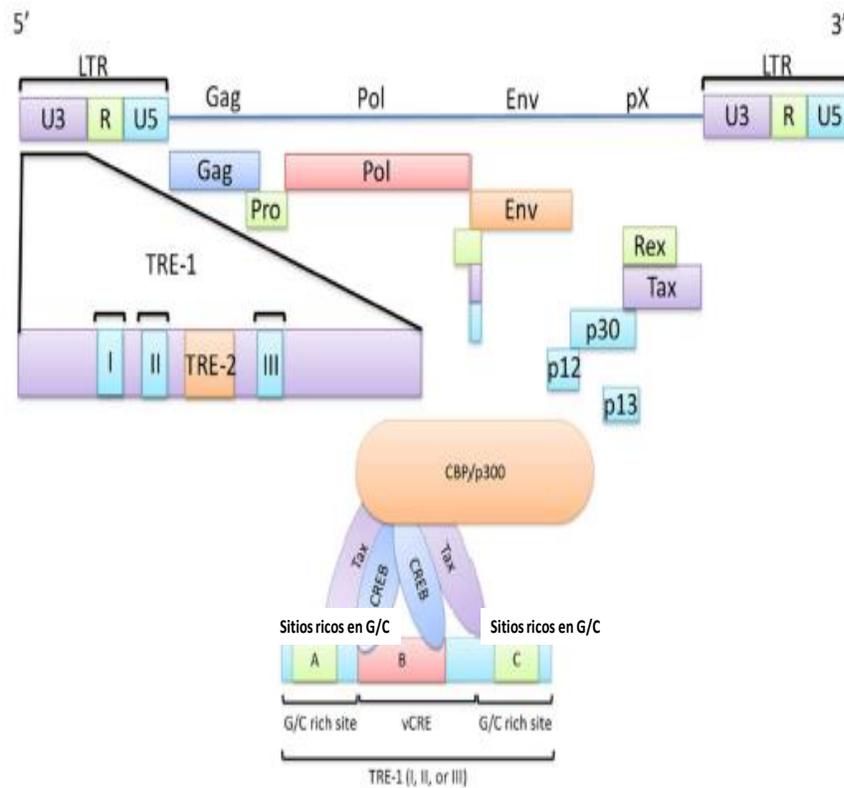
El gen *pol* codifica para la enzima transcriptasa reversa en el extremo amino-terminal y para la integrasa en el extremo carboxilo-terminal, ambas implicadas en la síntesis e integración del virus en el genoma del huésped en forma de provirus. Si bien no se conoce la estructura y conformación natural de la transcriptasa reversa de los HTLVs, se sabe que la enzima no posee actividad correctora ("*proofreading*"), existiendo la posibilidad de introducir errores en cada ciclo replicativo, y con ello, generar variabilidad genómica [29].

Un segundo ARNm codifica para la proteína precursora (gp61) de la región *env*, la que posterior a procesos de digestión enzimática y glicosilación origina dos glicoproteínas: una de transmembrana (gp21) y otra de superficie (gp46); la traducción de estas proteínas ocurre luego de un *splicing* simple del correspondiente ARNm [30, 31]. El tercer ARNm, derivado de la región pX contiene dos genes, *tax* (p40) ("trans-activator from X") y *rex* ("regulator of expression from X"), los cuales no se encuentran presentes en la mayoría de los retrovirus, y sintetizados a partir de un mismo ARNm policistrónico mediante *splicing* alternativo [25, 32, 33]. La proteína Tax es un transactivador de la transcripción de los genes virales y de algunos genes celulares, mientras que la proteína Rex actúa como un regulador post-transcripcional [26].

### **Secuencias LTR**

Las secuencias LTR (755pb), que flanquean el genoma proviral en sus extremos 5' y 3', son regiones no codificantes esenciales para la replicación viral, ya que son blancos de la integrasa, contienen sitios de fijación para la ARN polimerasa, promotores de la transcripción del ARN viral y son responsables de iniciar y regular la expresión viral. Hacia el extremo 3', la región es conservada y las islas CpGs son hipometiladas, indicando que la transcripción desde 3' es requerida para las

células infectadas [34]. El LTR se divide en U3, R y U5. Las secuencias de HTLV-1 son secuencias muy largas (174 pares de bases para U3, y 224 pares de bases para U5), comparadas con otros retrovirus. La región U3 es de importancia significativa en la transcripción mediada por Tax. Esta región contiene tres elementos de respuesta a Tax (TRE-1) y cada uno es capaz de reclutar el complejo Tax/CREB(*cAMP Response Element Binding*) /CBP/p300. TRE muestra tres dominios: A, B y C, en la cual B en conjunto con A o C es requerida para el complejo Tax/CREB/CBP/p300 para unirse al LTR [35]. La región U3 contiene el promotor vírico que contiene la caja TATA, la señal de poliadenilación (AATAAA), y otros elementos reguladores como los amplificadores de respuesta a Tax que contienen tres repeticiones de una secuencia de 21 pb llamadas TRE (*Tax response elements*), que corresponden a sitios de fijación para numerosos factores de transcripción de origen celular y de proteínas virales, implicadas además en el control del nivel de transcripción del ARN viral mediado por Tax. La región R contiene el sitio de iniciación de la transcripción, el sitio de poliadenilación y la mayor parte de la secuencia implicada en la formación de la estructura RRE (*Rex responsive element*). La región U5 contiene el sitio ATT, fundamental en la integración del provirus (Figura 3) [36]. El genoma viral se integra al genoma celular al azar. El HTLV-1 integrado al genoma celular posee 9032 bp, iniciándose la transcripción del mismo en la región R del 5´LTR [30].



**Figura 3.** Organización genómica del HTLV detallando TRE (Elementos de Respuesta a Tax) y la interacción entre el TRE-1 y complejo Tax/CREB/CBP/p300. *Adaptado de Curren et al., 2012*

### Región pX

Los HTLVs poseen una región regulatoria denominada *pX*, en su extremo 3' que contiene al menos cuatro marcos de lectura abiertos (ORF-I a IV) que codifican tanto para proteínas reguladoras, importantes para la regulación de la replicación viral (Tax, Rex, HBZ) como para proteínas accesorias (p12, p13, p30 en el HTLV-1, y p10, p11 y p28 en el HTLV-2, entre otras [27]). La proteína Tax regula la transcripción genómica mientras que Rex promueve el procesamiento y exportación nuclear del ARN viral, evento que es impedido por p30 [26].

Estas proteínas son traducidas desde diferentes ARNm que sufrieron simple o doble *splicing*. Los genes reguladores codifican para proteínas de regulación de la transcripción del ARN viral (p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup>, p21<sup>Rex</sup>), las que

probablemente desempeñan un papel en el establecimiento de la infección latente. El ORF-I codifica para la proteína p12<sup>I</sup>, probablemente implicada en la transformación celular y que se uniría a las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de la IL-2, interfiriendo en su transporte hacia la superficie celular. El ORF-II lo hace para las proteínas p13<sup>II</sup> y p30<sup>II</sup>, mientras que el ORF-III para p27<sup>rex</sup> (o Rex) y p21<sup>rex</sup> (molécula truncada de Rex) y el ORF-IV para p40<sup>tax</sup> (o Tax). A su vez, el gen regulador *tax* codifica para una fosfoproteína de 40 kDa en el HTLV-1 (p40<sup>tax</sup>) y de 37 kDa en el HTLV-2 (p37<sup>tax</sup>), que permiten la iniciación de la transcripción viral actuando en forma *trans* sobre el promotor viral TRE (*Tax Responsive Element*) y sobre promotores de algunos genes celulares [37]. La producción de las proteínas Tax y Rex involucra un doble *splicing* del ARNm; mientras que para las demás proteínas, involucran diferentes formas de *splicing* alternativo [38]. De esta manera la proteína p40<sup>tax</sup> actúa sobre el promotor viral TRE y promotores celulares implicados en la activación, división y proliferación de células infectadas, constituyendo uno de los primeros factores virales involucrados en el proceso de carcinogénesis atribuido a la infección por HTLV-1, mientras que la proteína p27<sup>rex</sup> disminuye tanto su propia expresión como la de la proteína p40<sup>tax</sup> [32].

### **Proteína Tax**

La oncoproteína Tax, de 42 kDa, es un transactivador de la transcripción de los genes virales, siendo esencial en la replicación de los HTLVs, ya que desregulariza la proliferación de la célula infectada y participa en la activación de algunos genes celulares [39]. Dentro de las funciones importantes de Tax en el proceso de malignidad se encuentran: la activación de la vía NF- $\kappa$ B al unirse a IKK $\gamma$ , progresión del ciclo celular alterando la vía de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), inducción de aneuploidia a través de la interacción con proteínas Tax 1BP2 y RANBP1 y alteración en los procesos de reparación del ADN inactivando p53, CHK1 y CHK2 [40].

Tax transactiva la transcripción del genoma de HTLV actuando sobre la región LTR en la región del promotor hacia el extremo 5', mediante la interacción con la proteína CREB y la formación de un complejo ternario Tax/CREB/promotor,

libera al genoma de la actividad de proteínas represoras de la transcripción, como la histona deacetilasa-1 (HDAC-1) y la histona metilasa (HMT) al interactuar con ellas [39].

Tax es capaz de mediar la activación de factores de transcripción de varios genes del huésped que intervienen en el crecimiento y diferenciación celular, como el gen de la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2 (IL-2r  $\alpha$ ), el de la cadena homónima del receptor para IL-15 (IL-15r  $\alpha$ ), el de las citoquinas IL-2, IL-13 e IL-15, el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), los oncogenes *c-fos* y *c-erg*, el factor estimulante de colonias granulocítico-macrófagos (GM-CSF), gracias a la activación del factor NF- $\kappa$ B, (*Nuclear Factor kappa B*), el cual es capaz de inducir la transactivación de estos genes [35]. El factor NF- $\kappa$ B es a su vez activado por Tax al promover su liberación del complejo formado con I $\kappa$ B (que lo mantiene secuestrado en el citoplasma) mediante la fosforilación de ésta por la quinasa IKK (I $\kappa$ B Kinasa), la que constitutivamente es activada en las células infectadas por HTLV-1 por TAK-1 (*TGF- $\beta$  Activator Kinase*). Tax no solo activa TAK-1 sino también promueve el reclutamiento de I $\kappa$ K hacia TAK-1, para favorecer su interacción [35]. La activación del factor NF- $\kappa$ B mediada por Tax resulta crítica para establecer el proceso de tumorigénesis. La desregulación del ciclo celular, con la consecuente inmortalización de la célula, y el desarrollo de los procesos leucémicos también se hallan mediados por la activación del factor CREB ya mencionado [31].

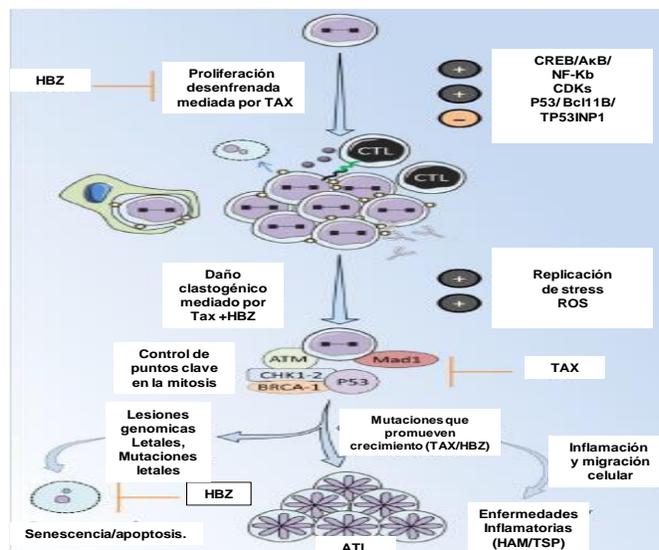
Si bien Tax actúa como activador transcripcional de muchas moléculas también actúa reprimiendo la transcripción de otras [41]. Por otro lado, interfiere con las funciones de otras moléculas, en general por unión directa a ellas, induciendo la inestabilidad genética y permitiendo a la célula infectada por HTLV-1 escapar del mecanismo de apoptosis (muerte celular programada). Tax también inhibe las señales del TGF- $\beta$  (citoquina que suprime el crecimiento de las células tumorales) y es así como la célula infectada logra escapar a la inhibición del crecimiento celular mediado por TGF- $\beta$  (Figura 4). Aunque Tax promueve la proliferación de las células infectadas, también es capaz de generar respuesta inmune y es el blanco de la acción de los linfocitos T citotóxicos (CD8 positivos)

[42]. Tax es una proteína viral importante en la replicación y proliferación de las células infectadas.

### **Factor de transcripción HBZ**

El gen *HBZ* codifica para el factor de transcripción HBZ codificado en la cadena complementaria del ADN proviral del HTLV-1, el cual posee dominios de cierre de leucina mediante los cuales interacciona con c-Jun, JunB o CREB-2 y suprime la transcripción viral mediada por Tax sobre el 5'LTR. Además, el HLA (Antígeno leucocitario humano) forma heterodímeros con proteínas de la familia CREB e interactúa con el factor 3 (ATF3) interfiriendo con la activación de p53 por ATF3, lo que sugiere un efecto anti-apoptótico de HBZ [43].

La expresión de la proteína HBZ es fundamental ya que se encuentra asociada al mantenimiento de la leucemia. Esta proteína es estimulada por Tax, aunque el efecto es dependiente del sitio de integración proviral. A su vez, HBZ inhibe el efecto transactivador que ejerce Tax sobre los genes virales. Así, las actividades que promueven el crecimiento mediado por Tax es contrarrestado por HBZ al mitigar la proliferación desenfrenada (Figura 4). Seguido de esto, se produce la activación de la respuesta inmune [39].



**Figura 4.** Efectos de Tax y HBZ en la proliferación y persistencia viral en el huésped.  
Adaptado de Hagiya et al., 2011.

### ***Proteína REX***

La fosfoproteína Rex de 27kDa codificada por el ORF III, posee acción post-transcripcional uniéndose a elementos respondedores en las regiones U3 y R del 3'LTR y aumentando la proporción de los transcritos sin *splicing* o con *splicing* simple (ARNm *gag/ pol* y *env*, respectivamente), requeridos para la síntesis de las proteínas estructurales. Así, la proporción de los transcritos con mayor grado de *splicing* (ARNm *tax/rex*) es menor y, de este modo, la producción de las proteínas regulatorias Tax y Rex se ve suprimida. Hay evidencias de que la proteína Rex también interacciona con Tax durante el control de la transcripción; a bajos niveles de Rex, ésta aumenta la transactivación mediada por Tax, mientras que a altas concentraciones, Rex actúa como inhibidor [44].

### ***Proteína p27<sup>rex</sup>***

La p27<sup>rex</sup>, de igual modo que Rev en el HIV-1, induce el pasaje de ARNs no clivados hacia el citoplasma e inhibe la expresión de los ARNs doblemente clivados, favoreciendo así la síntesis de proteínas virales estructurales [45]. El extremo carboxilo-terminal de Rex codifica a una proteína de 21 kDa (*p21<sup>rex</sup>*) cuya función todavía se desconoce [46].

### ***Proteína p12<sup>i</sup>***

Esta proteína es importante en la activación de células del huésped en estadios tempranos marcando la pauta en el establecimiento de la infección por HTLV-1. Posee capacidad de unión al CMH-I (Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I) disminuyendo su expresión en la superficie de la célula infectada y protegiendo al péptido viral de la lisis por linfocitos T citotóxicos. Posee una débil actividad oncogénica y se ha encontrado unida al receptor de la Interleuquina 2 (IL-2r) [32].

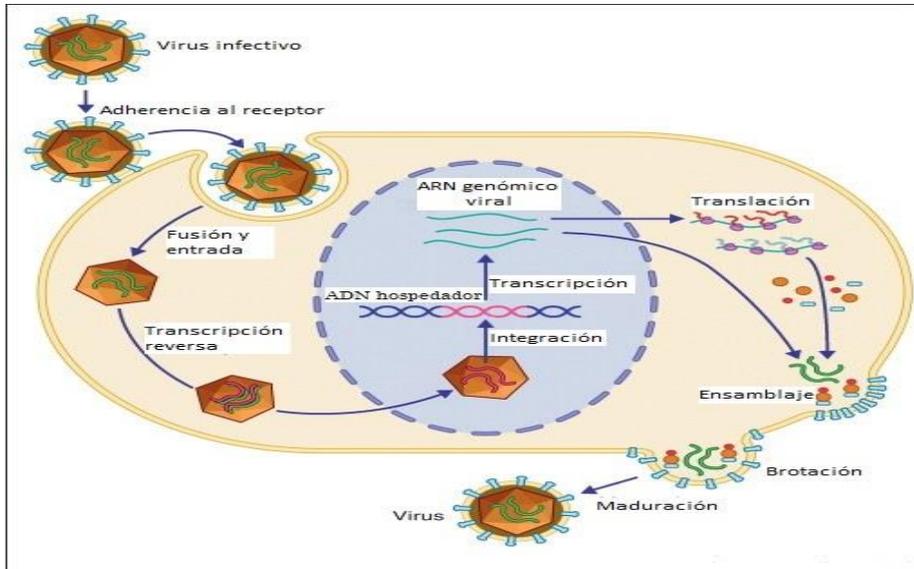
## Organización genómica del HTLV-2

La secuencia nucleotídica del HTLV-2 posee un 60%-70% de homología con el HTLV-1. Posee genes *gag*, *pol*, y *env* que codifican para proteínas estructurales y una región *pX* que codifica para las proteínas regulatorias Tax y Rex y para proteínas accesorias. Tax (p37 para el HTLV-2 o Tax-2) y Rex (isoformas p24 y p26 en HTLV-2) presentan funciones análogas a las del HTLV-1. Tax aumenta la tasa de transcripción por acción sobre los LTRs, modula la transcripción, la actividad de numerosos genes involucrados en el crecimiento, la diferenciación celular, reparación del ADN y transformación celular con capacidad oncogénica (si bien en menor medida que el HTLV-1) [47, 48]. Se sugiere que la menor potencia oncogénica de Tax-2 puede deberse a la ausencia de los motivos presentes en Tax-1. La proteína Rex truncada del HTLV-2 es la p22/20. Asimismo, la proteína p28 del HTLV-2 posee gran homología con p30 de HTLV-1 codificada por el ORF-II de la región *pX*, y posee similitud en su acción [47, 48].

## CICLO BIOLÓGICO Y VARIABILIDAD GENÓMICA DE LOS HTLVs

El ciclo de replicación de los HTLVs, como en otros virus, puede dividirse en las siguientes etapas: adsorción, penetración de la nucleocápside, liberación del genoma, inserción del genoma, transcripción, producción de proteínas y genoma, ensamblaje, brotación y maduración (Figura 5). El primer paso del ciclo replicativo del HTLV consiste en el reconocimiento de un receptor de superficie celular por la proteína gp46 de la envoltura.

Tres moléculas han sido establecidas hasta el momento como importantes en la interacción entre el HTLV-1 y la membrana celular, claves en la entrada del virus a las células: transportador 1 de la glucosa (GLUT-1), expresado en todas las superficies celulares de los vertebrados y considerado como el receptor del HTLV-1/2; proteoglicanos de Heparán sulfato (HSPGs) y la neuropilina-1 (NRP-1) [49].



**Figura 5.** Ciclo de replicación del HTLV-1. *Adaptado de Lairmore et al., 2012*

La envoltura del virus se pone en contacto primero con HSPG para luego formar complejos con la neuropilina-1, dándole estabilidad y posteriormente GLUT-1 se asocia al complejo y desencadena el proceso de fusión necesario para la entrada de la nucleocápside del virus al citoplasma celular [50]. El HTLV-1 infecta preferencialmente los CD4+, aunque también puede infectar otros tipos celulares como linfocitos CD8+, células dendríticas, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos B, células de la glía, astrocitos, células de la microglía, oligodendrocitos y neuronas, mientras que HTLV-2 infecta preferencialmente linfocitos T CD8+ (Carpentier 2015). Los complejos de receptores son diferentes para HTLV-1 y HTLV-2: mientras que HTLV-1 requiere HSPGs para una adhesión y entrada eficientes a la célula, los HSPGs no desempeñan un papel similar en el caso del HTLV-2. Ahora se sabe que los HSPGs y GLUT-1 son expresados de diferente manera en los linfocitos T CD4+ y CD8+, permitiendo que el HTLV-1 entre preferencialmente a los linfocitos T CD4+, y que el HTLV-2 lo haga preferencialmente en los linfocitos T CD8+ [49].

Luego del reconocimiento de las glicoproteínas de envoltura, la envoltura viral se fusiona con la membrana plasmática, lo que posibilita el ingreso de la nucleocápside al citoplasma, ya en el citoplasma, por decapsidación, se libera el ARN viral. En primera instancia se iniciará el proceso de transcripción del provirus

en una sola molécula precursora de ARN que será diferencialmente procesada por poliadenilación y splicing para generar las tres poblaciones de ARN subgenómico [26]. Este ARN genómico es copiado en una cadena simple de ADN por acción de la transcriptasa reversa viral dando lugar a un híbrido de poca estabilidad. El ARN es degradado por la ARNasa H, y a partir del ADN monocatenario se forma ADN doble cadena, el que es transportado al núcleo donde se integra al genoma celular por acción de la integrasa viral [26]. El ADN viral integrado o provirus está ya en condiciones de ser transcripto a ARN genómico, aunque puede permanecer como tal tanto tiempo como la célula sea viable [26]. Cabe señalar que los HTLVs no se integran en ningún locus específico sino que su integración es totalmente al azar, aunque hay otros autores que sugieren la existencia de sitios calientes importantes en el proceso de integración en el HTLV-1 hacia los isocoros ricos en GC [26].

El ensamblaje del virión tiene lugar en la proximidad de la membrana plasmática, donde previamente se han insertado las proteínas de envoltura ya glicosiladas y se efectúa por auto-asociación de precursores *gag*; sintetizados en ribosomas libres mientras que las proteínas de envoltura son sintetizadas en ribosomas asociados al retículo endoplasmático y transportadas hacia la membrana plasmática vía aparato de Golgi. Los precursores de cápside son transportados individualmente o en forma de pequeños agregados ya sea por interacción con elementos del citoesqueleto o en vesículas exocíticas. Esto posibilita que durante la brotación la progenie viral adquiera su envoltura con lípidos y proteínas pertenecientes a la célula huésped, entre ellas, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Después de integrado como provirus al genoma celular, los HTLVs también pueden multiplicarse por expansión clonal de la célula huésped durante la división celular, siendo éste el mecanismo principal de replicación de éstos virus [34].

Los PTLVs son muy estables genéticamente, a diferencia del HIV-1 que posee una importante variabilidad genómica. Esta escasa variabilidad genética se debe principalmente a la ausencia o baja frecuencia de ciclos replicativos durante la infección persistente. Durante esta etapa, la única manera que posee el virus de

multiplicarse es mediante la expansión clonal de las células que hospedan al virus. Esta baja variabilidad ha sido utilizada como herramienta molecular para una mejor comprensión del origen, evolución, y diseminación de estos retrovirus [23].

## REPLICACIÓN DEL HTLV

La infección por el HTLV-1 requiere para su establecimiento permanente que muchas células sean infectadas y alojen provirus en su genoma. Posteriormente a la infección, su diseminación depende de la capacidad replicativa de la célula infectada. Generalmente la infección por el HTLV-1 se produce en un número variable de linfocitos, los cuales se dividen para dar como resultado, diferentes poblaciones de clones de células infectadas. Este proceso se denomina expansión clonal y es una característica de la infección retroviral en células en activa proliferación [51]. La transmisión a través de partículas virales libres es ineficiente, siendo el principal mecanismo de transmisión del HTLV-1 por contacto célula a célula [49]. Se calcula que la infección por HTLV-1 mediada por células es 10.000 veces más eficiente que la infección por viriones libres [52]. Los mecanismos que se han descrito en cuanto a la transmisión del virus célula a célula son: Virofilm (por ensamblajes virales extracelulares tipo *Biofilm*), sinapsis virales, y conductos celulares [49] (Figura 6).

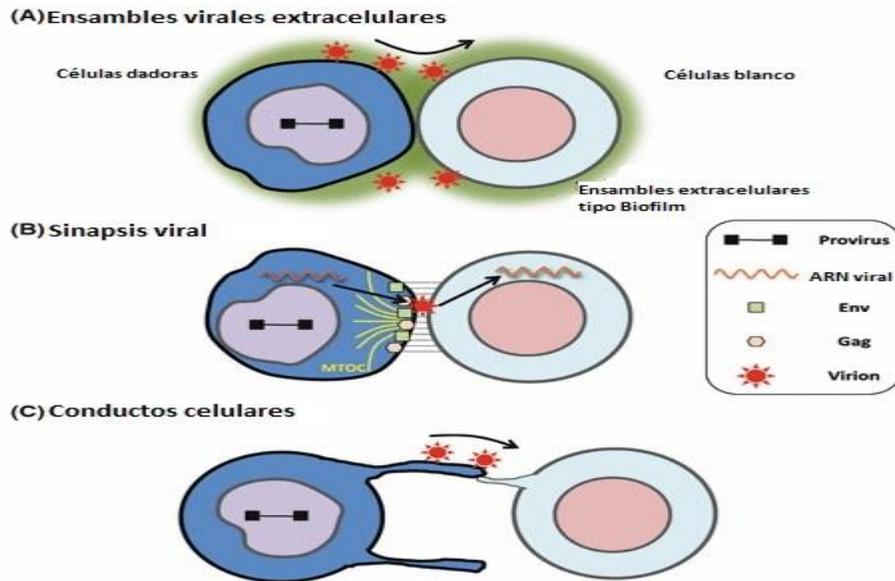
***Virofilms o ensamblajes extracelulares tipo Biofilm:*** la célula infectada con HTLV-1 presenta partículas virales adheridas a la cara externa de la membrana plasmática e inmersas en componentes de la matriz celular, similar a los *biofilms* bacterianos, a partir de la cual infectarían otra célula blanco [53, 54]. Estos ensamblajes extracelulares están compuestos de colágeno, agrina y otras proteínas de unión, como teterina y galectina-3. Cuando el virus está brotando, los viriones libres quedan atrapados en ésta matriz, la cual al adherirse a células no infectadas son transferidas rápidamente a la superficie de la célula blanco facilitando la infección [49].

***Sinapsis viral:*** a través de la sinapsis virológica, en el que intervienen componentes moleculares virales y celulares en un punto de contacto, el virus es

transmitido desde las células dadoras (infectadas) a las células blanco (no infectadas) [49].

Este mecanismo comprende la polarización del centro organizador de los microtúbulos (MTOC), formación de sinapsis y liberación de viriones en espacios extracelulares confinados a la sinapsis virológica entre una célula infectada y sin infectar. Estos eventos están mediados por la proteína viral Tax que interviene en la reestructuración interna del MTOC y adicionalmente participa en la desregularización del proceso mitótico de la célula infectada al inducir su expansión clonal y la replicación viral lo cual posibilita una baja exposición viral a los anticuerpos neutralizantes favoreciendo una infección persistente. Esta forma replicativa impacta en la baja variabilidad genética observada en los HTLVs, la cual es menor que la de otros retrovirus humanos como el HIV-1, ya que permite replicar el genoma sin utilizar la enzima TR la cual introduce mutaciones en alta frecuencia [53, 54].

**Conductos celulares:** el HTLV-1 codifica en su región pX una proteína llamada p8, generada por el procesamiento de p12<sup>l</sup>. Esta proteína al interactuar con LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de linfocito) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), potencia la conjugación de los linfocitos T e induce la formación de conductos entre los mismos, facilitando la transmisión viral de HTLV-1 a través de ellos [55].



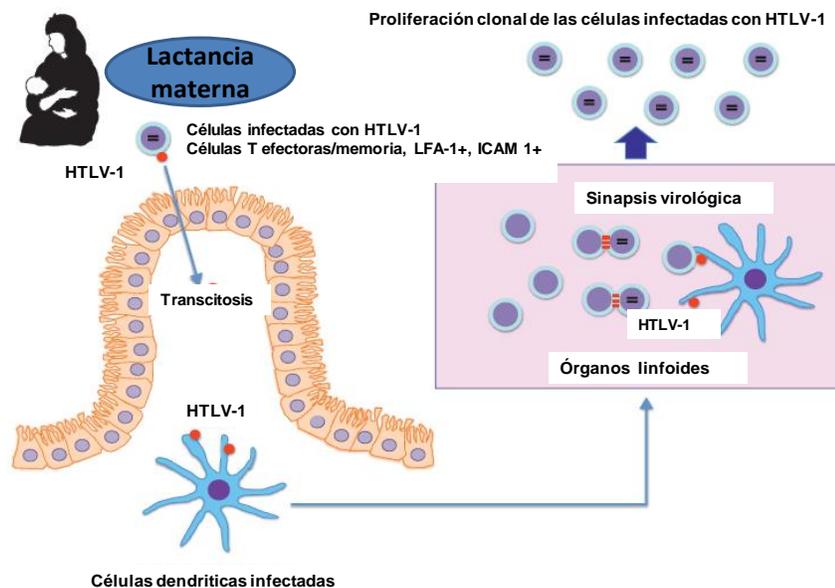
**Figura 6.** Mecanismos de transmisión célula a célula del HTLV-1.  
*Adaptado de Yasunaga et al., 2011.*

## VÍAS DE TRANSMISIÓN DE LOS HTLVs

El HTLV-1 es transmitido principalmente a través de la leche materna de madre a hijo (TMH), contacto sexual, vía parenteral a través de productos sanguíneos contaminados (que contienen linfocitos infectados) y por trasplante de órganos. Para cualquiera de las vías de transmisión, las células vivas infectadas son esenciales [1].

**Transmisión madre a hijo (TMH):** la transmisión de madre a hijo ocurre principalmente a través de la lactancia y la probabilidad de adquirir la infección aumenta si ésta se prolonga más de seis meses después del nacimiento [56, 57]. De los niños amamantados por madres HTLV-1 seropositivas, 10 a 25% se infectarán dependiendo de la población estudiada [58]. Si bien la transmisión viral perinatal o intrauterina también existe, es mucho menos frecuente, infectándose del 2 al 5% de los niños nacidos de madres seropositivas que no fueron amamantados. La seroconversión de los niños ocurre entre los 18 y 24 meses de edad [58]. Encuestas realizadas en Japón demostraron que programas de lactancia materna en madres portadoras de HTLV-1 disminuyen el hallazgo de donantes seropositivos para HTLV-1 [59]. La leche materna contiene células

provenientes de la sangre materna como linfocitos T y B, macrófagos, mastocitos y células epiteliales que no son destruidos por el tracto gastrointestinal del infante, conservando sus capacidades funcionales [60]. Las células infectadas por HTLV-1 poseen los inmunofenotipos de células T efectoras, las cuales al entrar en la leche materna, atraviesan el tracto digestivo por transcitosis, infectando a las células dendríticas, las cuales a su vez transmiten el virus a las células T no infectadas a través de sinapsis virológica. A la vez, estas células T infectadas aumentarán su población por expansión clonal, diseminándose en el organismo (Figura 7). Algunos factores como la carga proviral de la madre, el período de lactancia y la presencia de lactoferrina (que activa la transcripción del promotor LTR HTLV-1) contribuyen a aumentar la replicación viral y la incidencia de la infección [61]. Después de la infección, la carga de provirus (el número de células infectadas) y la tasa de clonalidad se determinarán por el equilibrio entre la expresión génica viral y la respuesta inmune del huésped [34].



**Figura 7.** Transmisión e infección *de novo* por HTLV-1.  
Adaptado de Matsuoka et al., 2013.

**Transmisión sexual:** el HTLV se encuentra en fluidos como el semen o secreciones vaginales. La transmisión sexual es más eficiente de hombre a mujer y de hombre a hombre, que de mujer a hombre [62]. Se estima que la posibilidad de transmisión hombre-mujer en una pareja estable al menos por 10 años, es de 60,8%, mientras que a la inversa esta probabilidad se reduce al 0,4% [63, 64]. La transmisión sexual se llevaría a cabo por los linfocitos infectados presentes en el fluido seminal [65]. En un estudio realizado en los EEUU, se observó que aproximadamente 25 a 30% de las parejas sexuales de donantes de sangre HTLV-1/2 seropositivos sin otro antecedente de riesgo, fueron infectadas [63].

**Transmisión parenteral:** el HTLV se transmite por transfusiones o intercambio de jeringas contaminadas como es el caso entre los UDIs. La transmisión de HTLV por transfusión sanguínea ocurre con mayor eficiencia si se transfunden componentes celulares (glóbulos rojos, plaquetas o sangre entera) [66]. La mediana de tiempo de seroconversión luego de una transfusión se estima en 51 días [66].

**Transmisión por trasplante:** estudios realizados en Estados Unidos, han observado que si bien las prevalencias de infección por HTLV-1/2 son más bajas en donantes de tejidos que en la población en general existe el riesgo de adquirir la infección a partir de trasplante de órganos. Algunos autores sugieren incluir técnicas moleculares con el fin de reducir el riesgo de infección para el receptor. Hay reportes sobre receptores de órganos tales como medula ósea, hígado y riñón, con serología negativa previa al trasplante, que seroconvirtieron luego de recibir el órgano desarrollando la HAM/TSP y ATLL [67, 68].

## **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL HTLV-1/2**

Ha sido sugerido que la introducción del HTLV-1/2 en el continente americano fue el resultado de las primeras oleadas humanas que ingresaron por el estrecho de Bering, integradas por grupos pertenecientes a distintas familias lingüísticas, algunos infectados por HTLV-1 y otros por HTLV-2 dando como resultado una fuerte restricción étnico/geográfica para ésta infección, que

actualmente se observa en nuestro continente. Así, se detecta infección endémica por HTLV-1 en comunidades originarias de las tierras altas precordilleranas y por HTLV-2 en comunidades originarias de las tierras bajas de América [69]. Además, se postula el ingreso de los HTLV-1/2 luego de la colonización española de América a través de la llegada de esclavos africanos 400 años atrás, y a mediados del siglo pasado con el ingreso de inmigrantes asiáticos principalmente de Japón (país endémico para la infección por HTLV-1) [69].

El HTLV-1 se encuentra distribuido globalmente e infecta aproximadamente a 20 millones de personas con cifras de prevalencia de infección que han permitido clasificar las áreas geográficas en alta, intermedia, y baja endemia. Las cifras con prevalencias elevadas ( $\geq 15\%$ ) se presentan en el sur de Japón, África, Melanesia, Irán e islas Seychelles; y las cifras con prevalencia intermedia (5-14%) se encuentran en el Caribe y algunas regiones de África Occidental; mientras que en Australia y países latinoamericanos como Colombia, Perú, Panamá, Brasil, Chile y Argentina presentan cifras con prevalencias bajas menores al  $<5\%$  [70].

En Latinoamérica con una población de 359 millones, se estima que existen de 3.7 a 7.4 millones de infectados y con una tasa de infección entre el 1% y 2% [71]. Los casos de infección por HTLV-1 se han reportado en Brasil, Colombia, Argentina, Perú, Guyana Francesa, Bolivia, Ecuador, Paraguay, Surinam, Uruguay, Venezuela y Chile, encontrándose en diferentes poblaciones étnicas como blancos, mestizos, mulatos, inmigrantes japoneses y mayormente en pobladores nativos suramericanos (Amerindios). La seroprevalencia aumenta con la edad y es mayor en mujeres que en hombres. [1]

Por otro lado, se estima que el HTLV-2 infecta alrededor de 3 a 5 millones de personas en diferentes partes del mundo, entre ellos se destacan poblaciones de aborígenes del continente americano e individuos originarios de Ghana, Guinea, Zaire y el Oeste de Camerún [5, 72, 73]. En Sudamérica se ha descrito en comunidades Kayapo y Khrano en Brasil, nativos residentes en el este del Amazonas como Munduruku, Arara do Laranjal y Tyrio, comunidades aborígenes en Colombia como los Wayuu, Guahibos, y Tunebos, Pumes en Venezuela

nativos de la Isla Chiloé y de la ciudad de Pitruken en Chile, y la comunidad originaria de Sanapanas en Paraguay [74-78].

A nivel mundial, se reportan cifras de prevalencia de HTLV-1/2 que oscilan entre 0.01% y 0.07% en donantes de sangre de áreas no endémicas y del 1 al 30% en poblaciones vulnerables según el grupo y la región estudiada [79-83]. En un estudio multicéntrico realizado en varios países de Europa en mujeres embarazadas, se demostró que la prevalencia del HTLV-1/2 era 6 veces mayor que en donantes de sangre de las mismas áreas [80].

## **FILOGENIA DEL HTLV-1/2**

El HTLV-1 se divide filogenéticamente en siete subtipos: Cosmopolita (a), África Central (b y d), Melanesia (c), Zaire (e), Gabón (f) y Camerún (g) [84]. El subtipo Cosmopolita se ha diseminado por todo el mundo y está compuesto por 5 subgrupos: Transcontinental (A), Japonés (B), África del Oeste (C), África del Norte (D), y Peruanos Negros (E) [84]. La caracterización molecular ha demostrado que el subgrupo A Transcontinental es el más ampliamente distribuido. Por otro lado, el subgrupo B Japonés ha sido detectado en Perú y Brasil en individuos inmigrantes de Japón, mientras que el subgrupo E de Peruanos de raza negra ha sido descrito en individuos de comunidades originarias con ascendencia negra [84, 85].

Si bien la mayor parte del genoma del HTLV-2 permanece estable, se observan variaciones considerables en la región promotora del retrovirus. El análisis filogenético utilizando esta región y la del gen *env*, demuestran 3 subtipos de HTLV-2: HTLV-2a, HTLV-2b y HTLV-2d [5]. Los subtipos a y b presentan un grado de identidad nucleotídica del 95%, y la divergencia nucleotídica dentro de cada subtipo es muy baja, de alrededor del 0,2 a 1% [86].

El subtipo a es el hallado en mayor proporción en UDIs, mientras que el subtipo b es el que se encuentra con mayor frecuencia en pigmeos y en comunidades originarias de América [87]. En Brasil se detectó un subtipo único de HTLV-2, llamado en un principio HTLV-2c en UDIs, pacientes HIV positivos y en comunidades originarias. Este subtipo poseía una proteína Tax similar a la del

subtipo b, mientras que el gen *env* y la región LTR eran similares al subtipo a. Estudios posteriores de genoma completo han demostrado que las cepas brasileñas eran en realidad variantes moleculares del subtipo a [88]. Por su parte, el subtipo d fue caracterizado a partir de un pigmeo Efe Bambuti de Zaire (actual República Democrática del Congo), en África Central [89].

## **PATOLOGIAS ASOCIADAS AL HTLV-1**

Las enfermedades asociadas al HTLV-1 pueden ser clasificadas en tres categorías: enfermedades neoplásicas (leucemias/linfoma), síndromes inflamatorios (mielopatías, uveítis, polimiositis) e infecciones oportunistas (hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* y dermatitis infecciosa en niños). Aproximadamente 1 a 5% de los portadores desarrollan una Leucemia/Linfoma a Células T del Adulto (ATLL) o una Mielopatía Asociada al HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) a lo largo de sus vidas. Ambas patologías son severas y no existen tratamientos eficaces. [90].

### ***Mielopatía Asociada al HTLV1/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)***

Es un síndrome neurológico desmielinizante caracterizado por destrucción celular y manifestación de un proceso inflamatorio en el sistema nervioso central que afecta primariamente la espina dorsal y el cerebro. Se define como una mielopatía progresiva crónica caracterizada por paraparesis espástica y se manifiesta en individuos de edad adulta siendo más prevalente en mujeres. El período de incubación es de 15 a 20 años, si la vía de transmisión es de madre a hijo o de tipo sexual, y de 3 meses a 3 años si es por transfusión [91]. Se caracteriza por una debilidad de miembros inferiores que incrementa progresivamente hasta llegar a una discapacidad motora invalidante. Con el tiempo, se establece una paraparesia espástica con aumento de reflejos tendinosos de miembros inferiores (hiperreflexia) y alteraciones en la micción (vejiga neurogénica) y ligeras alteraciones sensoriales con niveles torácicos pobremente definidos. Puede además observarse impotencia en hombres, calambres en miembros inferiores, dolor lumbar y estreñimiento. A diferencia de la

esclerosis múltiple, los nervios craneales no están involucrados, y la función cognitiva no se encuentra afectada [84].

El proceso histopatológico es meramente inflamatorio con una alta concentración de linfocitos T y monocitos en la sustancia gris y blanca de la médula espinal y posteriormente degeneración de la sustancia blanca [92]. Los mecanismos que llevan al HTLV-1 a desarrollar HAM/TSP incluyen: toxicidad causada por la respuesta específica mediada por linfocitos T citotóxicos, autoinmunidad, y daño tisular causado por citoquinas neurotóxicas [93].

Los criterios actuales de diagnóstico de HAM/TSP han sido establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [66]. La confirmación del diagnóstico de pacientes con mielopatía progresiva crónica que no padecen inmunodeficiencia, debe incluir también la detección de anticuerpos específicos anti-HTLV-1 en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR), además de excluir cualquier otra patología posible como tumores de médula espinal, lesiones compresivas y otras Mielopatía. Las actuales terapias que tienen por objeto reducir la replicación viral y/o la invasión de los tejidos no han producido resultados del todo satisfactorios. Los corticoides y andrógenos sintéticos son frecuentemente utilizados, especialmente en la fase inicial de la enfermedad debido a que mejoran los problemas motores, dolores y la disfunción urinaria [94, 95]. Se están ensayando terapias con interferón y análogos de nucleósidos para disminuir la expresión viral aunque los resultados siguen siendo limitados [96].

### ***Leucemia/Linfoma a Células T del Adulto (ATLL)***

Es una leucemia/linfoma linfocitaria T CD4+, endémica en el sur de Japón, donde fue descrita por primera vez en 1977 [15]. Tiene un período de incubación mínimo de 20 años con una edad de presentación promedio de 50 años y similar en ambos sexos. Se desarrolla con más frecuencia en individuos infectados por transmisión madre a hijo, lo que resulta en una mayor incidencia intrafamiliar [97]. Se han descrito casos excepcionales de ATLL postranfusionales [60]. La forma leucémica aguda presenta características clínicas semejantes a otras leucemias

agudas como infiltrados de células malignas en médula ósea, ganglios linfáticos y piel, afección de vísceras, huesos, pulmón e infecciones oportunistas con alteración de la función hepática, lesiones osteolíticas y distintos tipos de lesiones dermatológicas. Es la forma más frecuente de presentación (75%) aunque existen formas clínicas, crónicas, latentes y linfomatosas (25%). Los tipos de leucemia aguda y linfoma tienen peor pronóstico y la quimioterapia no es efectiva [98].

El diagnóstico debe considerar características clínicas, epidemiológicas y resultados de laboratorio, tales como la morfología de linfocitos, el inmunofenotipo, la histología de los tejidos afectados en los casos de linfoma; estudios serológicos para detección de anticuerpos anti-HTLV-1 en plasma/suero y estudios moleculares que permitan detectar el genoma viral en los cortes histológicos. El diagnóstico diferencial de ATLL incluye otras leucemias a células T. Son patognomónicos los linfocitos pleomórficos con núcleos hipersegmentados en forma de trébol en sangre periférica y la hipercalcemia [98]. La ATLL aguda tiene un curso rápidamente progresivo presentando una supervivencia de 6 a 9 meses por lo cual es común el sub-diagnóstico si no se cuenta con laboratorios especializados que permitan su clasificación en forma certera y rápida, antes de la precipitada evolución a un desenlace fatal. En cuanto al tratamiento, hasta el momento las terapias disponibles presentan una eficacia mínima. Una de las últimas estrategias empleadas para el tratamiento de las formas leucémicas, consiste en la utilización como terapia de inicio de combinaciones de Zidovudina/Interferon  $\alpha$  seguida de quimioterapia convencional, las cuales aumentan el promedio de supervivencia de 6 meses a 2/5 años [99]. Para la forma linfomatosa, la terapia inicial de elección sigue siendo la quimioterapia [100]. Otros tratamientos que implican el trasplante de células madre hematopoyéticas, terapias con anti-CCR4 en uso actual en Japón y otros como el ácido valproico están siendo actualmente investigadas [101].

## **FACTORES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE PATOLOGÍA**

El HTLV-1 se caracteriza por ser un virus lento, persistente y con baja virulencia, siendo el único retrovirus conocido hasta ahora capaz de producir

cáncer en humanos (ATLL) a través de la proteína Tax que tiene la habilidad de inmortalizar células T. Hasta el momento no se ha demostrado la existencia de una cepa viral neuropatogénica o leucemogénica y el riesgo de desarrollar alguna de las patologías asociadas estaría determinado por la vía de infección primaria, la carga proviral y factores genéticos del huésped [102-104].

**Vía de infección primaria:** si bien los mecanismos intrínsecos patogénicos relacionados a la vía de infección se desconocen, en base a datos epidemiológicos se ha asociado el desarrollo de ATLL con la TMH (a través de la lactancia) luego de décadas de un periodo asintomático, y de la HAM/TSP con la transmisión sexual (latencia también prolongada de décadas) o el contagio por transfusión sanguínea (con un período de latencia menor, de 3 meses a 3 años) [60, 61]. Sin embargo, excepcionales casos de ATLL han sido reportados en el mundo en receptores de órganos o por transfusión [105].

**Carga proviral:** otro factor principal de riesgo para desarrollar HAM/TSP es la carga proviral (número de copias integradas de HTLV-1 expresada como una proporción del número de copias del gen *pol* cada 100 células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)), ya que se ha observado que ésta es 16 veces más alta en pacientes con HAM/TSP que en portadores sanos [3]. La carga proviral de HTLV-1 permanece estable en un individuo por varios años, aunque puede presentar una variación interindividual importante; y posee valor predictivo en pacientes con HAM/TSP y ATLL aunque algunos pacientes con cargas virales altas pueden permanecer asintomáticos toda la vida. Los pacientes con HAM/TSP tienen una carga proviral de 10 a 100 veces mayor que los pacientes asintomáticos [104] y se debe a la presencia de un número elevado de clones [93].

**Factores genéticos del huésped:** los factores genéticos del hospedero son los principales determinantes en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas [104]. En 1974 Zinkernagel y Doherty demostraron que la respuesta de linfocitos T citotóxicos a infecciones virales era restringida por alelos del CMH-I (HLA- A, -B y -C) [106], como sucede en el caso del HTLV-1, mientras que las proteínas del CMH clase II (HLA -DR y DQ) de las células presentadoras de antígeno (CPA)

presentan péptidos a las células T CD4 vírgenes implicadas en montar la respuesta inmune frente a la infección [104]. En pacientes infectados con HTLV-1, la respuesta inmune frente al virus se caracteriza por una respuesta citotóxica y humoral vigorosa dirigida principalmente hacia la proteína Tax la cual transactiva genes celulares del huésped entre ellos la IL-2 y su receptor. Es así que para HTLV-1 se han analizado polimorfismos genéticos del hospedero para determinar la eficacia de la respuesta inmune del individuo en diferentes estudios poblacionales [103, 107].

Las variantes alélicas del HLA son consideradas determinantes en los niveles de la carga proviral de individuos infectados por HTLV-1 [108] y el principal factor genético involucrado en la susceptibilidad frente al desarrollo de HAM/TSP o ATLL debido a una respuesta inmune crónica que contribuye al desenlace de la patología [104] [3]. Estudios realizados en Japón han demostrado que la presencia de HLA-A\*02 y C\*08 se asociaban a una disminución significativa de los niveles de carga proviral y al riesgo de presentar HAM/TSP entre los portadores asintomáticos; en contraposición a la presencia del alelo HLA B\*54, el cual estaría asociado con el desarrollo de HAM/TSP y un aumento de la carga proviral [104], al igual que HLA B\*07, HLA-B \*54:01 y el haplotipo Cw\*0702-B\*0702-DRB1\*01:01-DQB1\*0501 [108]. Además, en Japón se han reportado focos de pacientes con ATLL o HAM/TSP, en familias portadoras de HTLV-1 [109, 110]. La presencia de *clusters* familiares para una de las dos enfermedades, confirmaría que existen factores del huésped que pueden influenciar en la susceptibilidad a desarrollar la patología [108]. Una segregación similar de ATLL y HAM/TSP fue observada en poblaciones afro-caribeñas y afro-colombianas con características hematológicas y clínicas similares a las encontradas en la población japonesa [111, 112]. Por otro lado, similar a otras enfermedades infecciosas, un gran número de individuos infectados con HTLV-1 permanecen como portadores durante toda su vida sugiriendo que la respuesta inmune desarrollada por linfocitos CD8 es efectiva para controlar la proliferación viral y mantener un rol protector en estos individuos asintomáticos para el desarrollo de patología [113]. En la Tabla 1 se detallan diferentes haplotipos asociados a patología reportados en la literatura.

**Tabla 1.** Listado de alelos de HLA asociados con protección/susceptibilidad a las patologías asociadas al HTLV-1 reportados en estudios previos.

PAIS [Referencia]	N, POBLACIÓN	ALELO PROTECTOR	ALELO PATOGENICO
Jamaica [114]	N=45 PA N=25 ATLL	HLA-A*02 HLA-A*33	HLA-A*36 HLA-A*03 DQB1*0501
Japón [115]	ATLL HAM	-	*DRB1-DQB1 (0901-0303,15,01-06-02,1401-0503)
Africa [116]	N=45, PA N=49, ATLL N= 51, DS	-	HLA-DRB1*1501 HLA-DQB1*0602 HLA-A*36 HLA-B*18 HLA-DRB1*1101
Japón [104]	N=233, HAM N=202, DS	HLA-A*02, Cw*08	HLA-B*0702 Cw0702 DRB1*0101 DQB1*0501 HLA-B*5401
Japón [117]	PA ATLL HAM	-	HLA-A*26 HLA-B*4002 HLA-B* 4006 HLA-B*4801
Brasil [118]	HAM	HLA-A*02	-
Irán [119]	N=74, PA N=58, HAM	-	DRB1*0101 HLA-B*5401
Brasil [120]	N=93, PA	HLA-A*02	-
Irán [121]	N=PA N=HAM	Cw*08	HLA-DRB1*01
Jamaica [122]	N=56, ATLL N= 59, HAM	DQB1*0501 HLA-A*03	HLA-DRB1*1503 HLA-B*53 HLA-B*15
Japón [123]	N=202, PA N=230, HAM	HLA-A*0201 Cw*0801	HLA-B*5401
Perú [124]		HLA-A*02	-
Irán [125]	N=50, HAM	No hubo asociación: HLA-A*02, Cw*08 HLA-A*24	-
España [108]	N=40, PA N=20, HAM	-	HLA-B*5401 ausente HLA-B*07 HLA-DRB1*01:01

ATLL: Linfoma/Leucemia a Células T del Adulto, HAM/TSP: Mielopatía asociada al HTLV-1, DS: donantes de sangre, PA: portador asintomático.

## HLA E INFECCIÓN POR HTLV-1/2

En Trinidad y Tobago, se han reportado casos de HAM/TSP y ATLL predominantemente en individuos de raza negra [126]. En Zaire, la HAM/TSP afecta a un grupo minoritario de la tribu Mundunga [127]. Por lo tanto, desde el punto de vista étnico el factor genético parece estar implicado con el desarrollo de HAM/TSP o ATLL [7]. Como se mencionó previamente, los retrovirus HTLV-1/2 llegaron al continente americano con las primeras migraciones humanas infectadas desde el continente asiático, en distintas oleadas que dieron lugar en Sudamérica a una restricción étnica/geográfica para estas infecciones [7]. Los estudios de HLA realizados por Lou y sus colaboradores en una comunidad rusa denominadas los "Nivkhi" tomaron como base el análisis de determinantes alélicas de HLA clase I y HLA clase II de un grupo de 53 individuos que incluía 4 portadores de HTLV-1, donde los principales alelos encontrados para HLA clase I fueron A\*24, A\*02, B\*40, B\*48, B\*27, y B\*35 con frecuencias alélicas similares a la población nativa de los "Orochon", (población nativa al Noreste de China) y alelos para HLA clase II como: DRB1\*0901, DRB1\*1401, DRB1\*1201, DRB1\*1106 con frecuencias alélicas similares a los "Ainu" en Hokkaido Japón. Estos datos demostraban que los Nivkhi estaban remotamente relacionados a japoneses y mongoloides asiáticos [128]. A su vez, se demostró que estas poblaciones estaban relacionadas con las comunidades de Amerindios en Sudamérica. Se sugirió que los "Nivkhi" estarían genéticamente relacionados con grupos mongoloides del nordeste asiático, infectados por HTLV-1 en un pasado lejano, anterior a la divergencia de los principales grupos étnicos mongoloides actuales [128].

Las investigaciones de Fujiyama y colaboradores describieron en comunidades amerindias de Sudamérica, haplotipos de HLA II (DRB1\*-DQB1) en individuos infectados con HTLV-1 y HTLV-2 y demostraron que portadores de HTLV-1 de los Andes poseen uno de los 5 haplotipos de HLA: DRB1\*-DQB1\*0403-0302,0802-0402,0901-0302, los portadores de HTLV-2 de la región del Orinoco en Colombia portan uno de los 3 haplotipos de HLA: DRB1\*-DQB1\*1402-0301,1602-0301 y 0404-0302; y observaron que los haplotipos

encontrados en la región de los Andes y del Orinoco eran exclusivos en comparación con otras comunidades endémicas [77]. Los haplotipos asociados con portadores de HTLV-1 fueron encontrados en las comunidades originarias de los Andes y Japoneses en las cuales el virus se considera endémico, mientras que los haplotipos asociados con portadores de HTLV-2 fueron encontrados en los pobladores del Orinoco y Norteamérica, en las cuales este tipo viral también es endémico; datos que sugieren que los haplotipos de HLA podrían hallarse segregados étnicamente entre los nativos de Sudamérica y estar involucrados en la susceptibilidad frente al HTLV-1 y HTLV-2.

Por otra parte estudios recientes han determinado que los receptores para moléculas de CMH-I (KIR), presentes en las células *natural killer (NK)*, estarían involucrados junto con el HLA en potenciar dicha susceptibilidad o protección frente al desarrollo de la enfermedad [93]. La presencia del genotipo KIR2DL2 potencia el efecto protector y/o patogénico del HLA clase I en la inmunidad frente al HTLV-1, y es dependiente del contexto presentado por el tipo de alelo de HLA encontrado: si es una molécula de HLA clase I protectora mejora su efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad, y, si es una molécula de HLA clase I patogénico potencia la susceptibilidad frente a la enfermedad [129].

**Tabla 2.** Listado de alelos asociados a susceptibilidad para la infección por HTLV-1/2 según el origen étnico.

PAIS [Referencia]	POBLACIÓN	ASOCIACIÓN CON HTLV-1	ASOCIACIÓN CON HTLV-2
Rusia [128]	Nivkhi	HLA A*24,A*02, B*40, B*48, B*27, B*35	-
Japón [115]	Japoneses	HLA-A*24, A*26, B*7, B*61, Cw1, Cw7 DRB1 *0101, 0803, 1403, 1501,y 1502 DQB1 *0303, 0501 y 0601	-
Colombia [130]	Indígenas Wayuu	-	HLA DQB1*0302, HLA DRB 1*0411, DQB1*0302
Martinica [131]	Afro-caribeños franceses	No asociación con HLA DRB1*11, 15, HLA A*02	
Colombia [132]	Indígenas Orinoco	HLA DRB1*DQB1*0403-0302;0802-0402, 0901-0303,1406-0302	HLA DRB1, DQB1*1402-0301, 1602-0301 Y 0404-0302

## **SITUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR HTLV-1/2 EN ARGENTINA**

La presencia de HTLV-1/2 fue reportada por primera vez en nuestro país en un grupo de UDIs de la ciudad de Buenos Aires, en 1989; y estudios posteriores, fueron detectando tanto al HTLV-1 como al HTLV-2, en otras poblaciones vulnerables [133, 134]. En 1993, se observó que similar a otras comunidades originarias del continente americano, la infección por HTLV-2 era endémica en los Tobas y Wichis de la Región Chaqueña (Formosa, Chaco) y se confirmó la importancia de la transmisión del virus de madre a hijo muy probablemente debido a los largos períodos de lactancia que acostumbran dichas poblaciones [135, 136]. Luego, se detectó este virus en una comunidad Mapuche del Sur [136]. A partir de 1994, se describe la presencia de ambos virus en donantes de sangre de Buenos Aires, con cifras de prevalencia similares a las observadas en donantes de países no endémicos y la infección por HTLV-1 también fue detectada en hemodializados de diferentes centros de Buenos Aires [137, 138]. Asimismo, se fueron informando en forma esporádica casos de las patologías asociadas al HTLV-1. [139, 140]

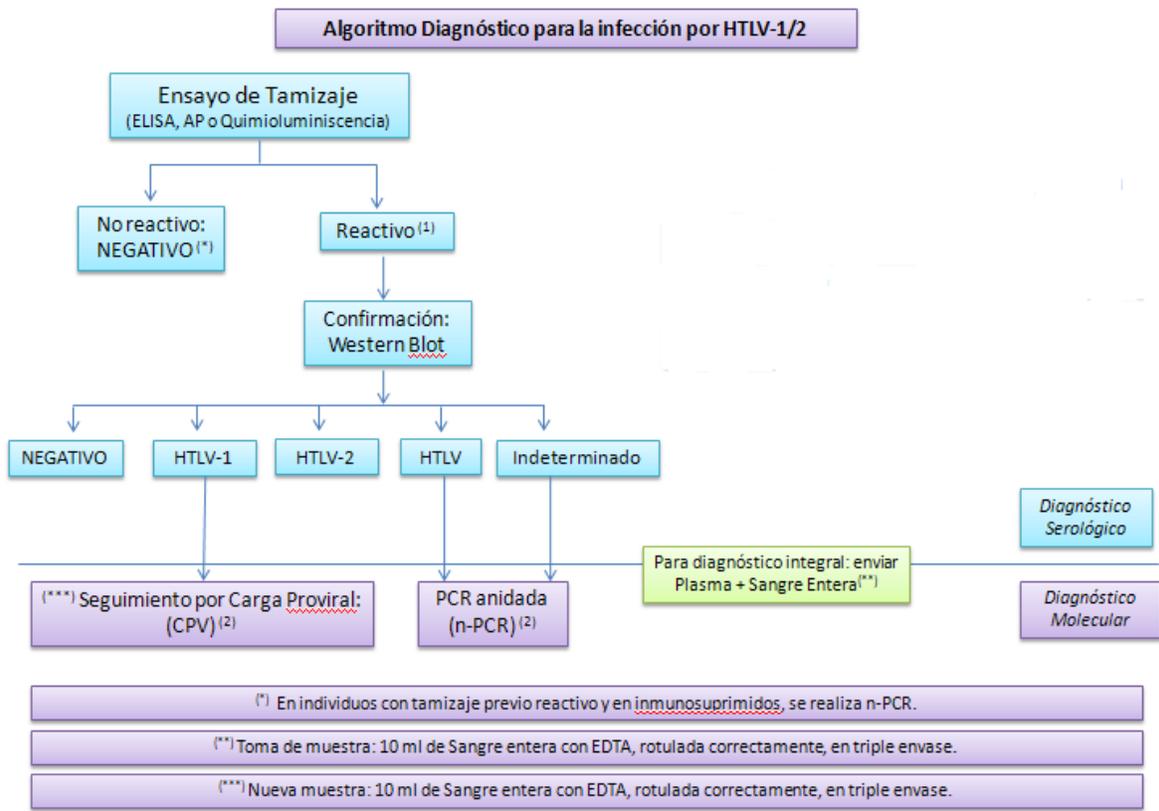
En el año 1990 se reporta el primer caso de HAM/TSP en Argentina luego, en 1994, se describieron otros casos de la enfermedad en la provincia de Salta y en pacientes UDIs HIV positivos de Buenos Aires [139, 140]. Por otra parte, en 1995, fueron descriptos por primera vez, 5 casos de ATLL en San Juan y más tarde se informó sobre un caso de ATL y un linfoma por HTLV-1 en un grupo familiar [141, 142]. Más aún, en 1998 se observaron nuevos casos de HAM/TSP en un servicio de neurología de la ciudad de Buenos Aires [143]. Así, Argentina fue considerada como no endémica para la infección por HTLV-1, hasta que se reportó por primera vez, una mayor prevalencia en comunidades originarias (2.3%) y donantes de sangre de la provincia de Jujuy (1%) y Salta (0.71%) [144-147]. Como era previsible para una zona de infección endémica, focos de HAM/TSP y ATLL también fueron detectados en la región [148, 149]. Al presente es una certeza que tanto la infección por HTLV-1 como sus enfermedades asociadas, HAM/TSP y ATLL, son endémicas en el Noroeste argentino. Y de forma similar a lo que ocurre en Latinoamérica, en nuestro país podemos observar una restricción

étnica/geográfica con comunidades originarias del Noroeste infectadas por HTLV-1 y otras de la Región Chaqueña infectadas por el HTLV-2[135, 136, 150, 151]. En 2005, un estudio publicado por nuestro grupo en colaboración con el Programa Nacional de SIDA y los Programas de SIDA Provinciales confirmó cifras de prevalencia endémicas de estos virus en donantes de sangre de esas regiones y bajas en el resto del país, y estudios más recientes fueron demostrando nuevamente prevalencias mayores en diferentes poblaciones vulnerables [152, 153].

En relación a la población general, un estudio multicéntrico coordinado por el grupo de HTLV del INBIRS, confirmó la circulación de ambos virus en mujeres embarazadas de áreas no endémicas. En el mismo, se identificaron 3 mujeres infectadas por HTLV-1 (2 coinfectadas con HIV-1) y 3 por HTLV-2. Las mismas eran residentes de la ciudad de Buenos Aires, Neuquén y Ushuaia y en relación a los antecedentes de riesgo reportaron ser pareja de individuos UDIs o HTLV-1/2 positivos o bien ser descendiente o provenir de un área endémica (Salta, Bolivia y Perú). Los estudios filogenéticos en esta población identificaron a los HTLV-1 como a (Transcontinental Cosmopolita) y a los HTLV-2 como b; coherente con reportes previos en los cuales se demuestra a estos subtipos como mayoritarios en comunidades originarias del Noroeste y de la Región Chaqueña, respectivamente [154]. Luego, se describió también la circulación de estos subtipos, tanto en residentes de Buenos Aires como en donantes de sangre de áreas no endémicas, la mayoría de ellos de origen caucásico [154, 155].

## **DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR HTLV-1/2**

El algoritmo actual para el diagnóstico de la infección por HTLV-1/2 se basa en la detección de anticuerpos anti-HTLV-1/2 en plasma por técnicas de tamizaje, ya sea ELISA, Aglutinación de Partículas o Quimioluminiscencia. Las muestras repetidamente reactivas deben luego ser confirmadas por una técnica adicional, aún más específica, como lo es el Western Blot (WB). El WB puede brindar cinco resultados posibles (Figura 8): HTLV-1 seropositivo; HTLV-2 seropositivo; HTLV sin clasificación en tipo; Indeterminado o Negativo.



**Figura 8:** Algoritmo diagnóstico de la infección por HTLV-1/2. Adaptado del Grupo de HTLV de Medicina Traslacional del INBIRS.

En el caso de los resultados HTLV sin tipificar e indeterminados por WB, se debería confirmar mediante una técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa de tipo anidada o *nested-PCR* (n-PCR), la cual posibilita detectar genes del provirus presentes en las células T. El resultado podrá considerarse positivo cuando se registren al menos dos fragmentos de genes virales distintos [156]. En el caso que la confirmación no pudiera realizarse, se recomienda realizar un seguimiento serológico durante un año para verificar seroconversión. En los últimos años, se ha implementado la cuantificación de la CPV de HTLV-1/2 a partir de células de pacientes infectados utilizando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) y se ha publicado recientemente la puesta a punto de una PCR multiplex cuantitativa en tiempo real (mq-PCR), capaz de cuantificar la CPV de ambos virus, HTLV-1 y 2 [157, 158]. Un estudio reciente de nuestro grupo ha demostrado que casos seroindeterminados por WB confirmados positivos para la infección por

HTLV-1 por técnicas moleculares, podrían estar asociados a una baja (CPV) [159]. También se ha propuesto que la determinación de la CPV podría ser utilizada como indicador del curso de la infección en portadores asintomáticos para evaluar la propensión al desarrollo de las patologías asociadas a la infección por HTLV-1. Además, existen evidencias que sugieren una relación directa entre los niveles de CPV y severidad de enfermedad, aunque debemos considerar que el nivel de la CPV difiere significativamente entre individuos infectados [160]. La CPV además de ser una herramienta importante en el monitoreo biológico de la progresión de la enfermedad también puede utilizarse para monitorear la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos o antirretrovirales [157]. Sin embargo, la qPCR, como ha sido reportado previamente, aún no es lo suficientemente sensible en comparación a la nested-PCR [159, 161].

## OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis de maestría es aportar mayores conocimientos sobre la infección por HTLV-1/2 en Argentina, realizando un análisis descriptivo de los casos estudiados por el Grupo HTLV de Medicina Traslacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), las cepas circulantes y los polimorfismos específicos de HLA en relación a las patologías asociadas al HTLV-1 detectadas en nuestro país.

### Objetivos específicos

1. Evaluar las características epidemio-demográficas de todos los casos procesados para diagnóstico de HTLV-1/2 por el grupo de HTLV del INBIRS en el periodo comprendido entre 1998 y 2014.
2. Estimar la frecuencia y características epidemiológicas de casos confirmados como HTLV-1 y HTLV-2 diagnosticados en el INBIRS.
3. Estimar la frecuencia y características epidemiológicas de los casos con patologías asociadas al HTLV-1.
4. Analizar filogenéticamente las cepas HTLV-1 detectadas en individuos con patologías asociadas a la infección.
5. Determinar la carga proviral de los individuos que presentan patologías asociadas al HTLV-1.
6. Identificar alelos de HLA relacionados con susceptibilidad y/o protección para HAM/TSP y ATLL en pacientes de Argentina y su asociación con los niveles de carga proviral.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Tipo de estudio**

Se realizó un estudio retrospectivo de todas las muestras ingresadas consecutivamente en el INBIRS para el diagnóstico de HTLV-1/2 entre enero de 1998 y diciembre de 2014.

## **Población estudiada**

Se estudiaron muestras del grupo HTLV del INBIRS correspondientes a individuos que requirieron por distintos motivos el diagnóstico de HTLV-1/2 entre enero de 1998 y diciembre de 2014. El “Grupo HTLV de Medicina Traslacional” del INBIRS es referente nacional en HTLV para el Plan Nacional de Sangre y la Red de Laboratorios de la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”, por lo que recibe muestras derivadas de bancos de sangre y servicios hospitalarios de la red pública y privada, tanto de la capital federal como del interior del país. En algunos casos el mismo individuo concurre al instituto donde se realiza la extracción de sangre.

A continuación se detalla brevemente el procedimiento. Conforme a la Ley Nacional N° 23.798 y el Manual de Sistema de Gestión de Calidad del INBIRS se realiza el registro manual y electrónico de los casos mediante la asignación de: a) número del INBIRS que contiene el año de ingreso seguido de un número consecutivo de tres dígitos con el cual se rotula la muestra y b) el código INBIRS conformado por la letra F o M, según corresponda a femenino o masculino, las dos primeras letras del nombre, las dos primeras del apellido y la fecha de nacimiento (dd/mm/año). También se registran datos como número de documento, ciudad de origen; tipo de muestra, diagnóstico presuntivo, entre otros. Se realiza una entrevista personal para brindar información y contención al paciente además de suministrar información relacionada con los procedimientos a realizar. Posterior a esto, en caso de aceptar realizarse la prueba, se lleva a cabo el registro de la firma en el Consentimiento Informado. La información recolectada en este proceso y los resultados previos obtenidos en otros laboratorios se mantienen bajo estricta confidencialidad dentro de un marco ético-legal vigente siguiendo las

recomendaciones internacionales para estudios epidemiológicos (CIOMS, Ginebra 1991).

Una vez realizado el diagnóstico de HTLV-1/2 se procede a elaborar el informe según el Manual de Procedimientos del Grupo HTLV de Medicina Traslacional los cuales son entregados en el INBIRS o enviado por correo electrónico al profesional solicitante. En nuestro instituto, los resultados POSITIVOS son entregados por el médico responsable del Grupo HTLV, ofreciéndole al paciente el asesoramiento pertinente, así como la oportunidad de adherir a un plan de seguimiento mediante consultas periódicas.

### **Aspectos éticos**

Este proyecto ha sido evaluado y aprobado por un Comité de Ética externo (Nexo Asociación Civil) bajo el número de protocolo 3008/08/2012.

### **Tipo de muestra**

En el INBIRS se reciben diferentes tipos de muestras (plasma, sangre entera, LCR) dependiendo del caso y la disponibilidad de los centros de derivación. Cuando el individuo concurre al INBIRS se procede a una extracción de sangre entera periférica recolectada con EDTA (10ml) y a partir de esta muestra primaria se separa y conserva plasma, sangre, y/o CMSP, según el caso.

**Plasma y sangre entera:** la sangre periférica extraída del paciente es centrifugada a 1900 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Luego el plasma es separado, alicuotado y almacenado en tubos eppendorff a -20°C previamente rotulados con su código correspondiente. Durante el mismo proceso y de la misma manera se procedió también a alicuotar y guardar 500ul de sangre entera.

**Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP):** la obtención de las CMSP se realiza mediante la técnica de Ficoll-Hypaque. Las CMSP obtenidas son fraccionadas en tubos conteniendo 2 millones de células y conservadas a -70°C hasta su utilización para la extracción de ácidos nucleicos.

**Extracción de ADN:** la extracción de ADN se realiza de rutina en los casos que se necesite una confirmación molecular, además de haberse hecho exclusivamente en las muestras seleccionadas para el análisis de HLA. Para ello se utilizan columnas con membrana de sílica (ADN PuriPrep-S kit, Highway®, Inbio, Tandil, Argentina) ya sea a partir de células conservadas a -70°C o de sangre entera anticoagulada con EDTA, a temperatura ambiente o conservada a -20°C.

## **DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HTLV-1**

El diagnóstico de HTLV-1/2 requiere la detección y discriminación de los anticuerpos específicos dirigidos contra ambos tipos virales. De inicio se utilizan las denominadas pruebas de tamizaje o *screening*; y luego para la discriminación entre anticuerpos específicos dirigidos contra uno u otro virus, se emplean pruebas confirmatorias como puede ser un western blot. En algunos casos es necesario realizar el diagnóstico molecular. Este procedimiento se realiza bajo los lineamientos del Manual de Sistema de Gestión de Calidad del INBIRS para el diagnóstico de HTLV-1/2. El algoritmo se detallada en la Introducción de ésta tesis (Figura 8).

## **DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO**

### **Pruebas de tamizaje**

El tamizaje de anticuerpos anti-HTLV-1/2 incluyó pruebas de alta sensibilidad como el ensayo por aglutinación pasiva de partículas de gelatina (AP) (Serodia HTLV-1, Fujirebio, Tokyo, Japan) y/o un enzimoimmunoensayo (ELISA); actualmente se utiliza uno de tercera generación. Independientemente del resultado obtenido en el tamizaje anterior realizado en otro laboratorio (para el caso de muestras derivadas), se procede a realizar una nueva prueba de tamizaje. Los resultados posibles para las distintas pruebas se detallan a continuación:

**Agglutinación de partículas:** a continuación se detalla el patrón de las partículas de gelatina, su lectura e interpretación (Tabla 3).

**Tabla 3:** Lectura e interpretación de los resultados de la prueba de aglutinación de partículas.

Patrón de las partículas	Lectura	Interpretación
Concentradas en forma de botón, en el centro del pocillo con borde externo circular y liso	(-)	Negativo
Concentradas en forma de un anillo compacto con un borde externo circular y liso	(+/-)	No concluyente (se repite)
Anillo grande con borde externo rugoso multiforme y aglutinación periférica	(+)	Reactivo
Aglutinadas, cubriendo el fondo del pocillo uniformemente	(++)	

**ELISA:** las marcas frecuentemente utilizadas durante todos estos años fueron: HTLV I&II Ab (ULTRA version) (Dia.Pro), MP Diagnostics HTLV-I/II ELISA 4.0, bioelisa HTLV I+II 5.0 (Biokit) y Murex HTLV I+II. En todos los casos de siguieron estrictamente las instrucciones provistas por los fabricantes.

### Prueba confirmatoria

**Western Blot:** Todas las muestras que resultaron repetidamente reactivas y/o discordantes por alguno de los ensayos de tamizaje realizados, fueron confirmadas por WB (HTLV blot 2.4, Genelabs Diagnostics, Science Park, Singapore) de acuerdo al algoritmo diagnóstico recomendado por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, Estados Unidos y la HTLV European Research Network (HERN)[162, 163]. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo estrictamente las instrucciones provistas por los fabricantes (Tabla 4).

**Tabla 4:** Patrón de las bandas observadas en el Western Blot e interpretación de los resultados.

Patrón	Interpretación
Sin reactividad frente a proteínas específicas de HTLV	SERONEGATIVO
Reactividad frente a gag (p19 y/o p24) y ENV (GD21 y rgp 46-I)	HTLV-1 SEROPOSITIVO
Reactividad frente a gag (p19 y/o p24) y ENV (GD21 y rgp 46-II)	HTLV-2 SEROPOSITIVO
Reactividad frente a GAG (p19 y p24) y ENV (GD21)	HTLV SEROPOSITIVO*
Bandas específicas de HTLV que no coinciden con el criterio para seropositividad de HTLV-1, o HTLV-2 o HTLV.	INDETERMINADO*

\*En el caso con resultados Indeterminados o HTLV y cuando se contaba con la muestra adecuada se procedió a realizar el diagnóstico molecular.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El diagnóstico molecular se implementó en el INBRS en el año 2002 y se realiza en todos los casos HTLV no tipificados e indeterminados por WB y desde el año 2014 en todos los casos con resultado de tamizaje no reactivo en nuestro laboratorio pero con un resultado previo reactivo (motivo de derivación de la muestra) de contar con el material adecuado. Se realiza mediante una nested-PCR: se amplifica una región de los genes *pol* y *tax* del genoma viral específica de cada tipo viral, HTLV-1 y HTLV-2. La mezcla de reacción para la primera amplificación consiste de 5 µl de buffer 10x; 4µl de Cl<sub>2</sub>Mg 50mM; 1µl de dNTPs 10mM; 1µl del cebador (10µM), 0.25µl de Taq Pol 5U/µl; 27,75 µl de agua y 1 µg de ADN genómico. El volumen final es de 50µl. Para el gen *pol* del HTLV-1 se emplean los cebadores SK110-I y SK111-I; y SK110-II y SK111-II para el HTLV-2. Para el gen *tax* del HTLV-1 se utilizan los cebadores SK43-I y SK44-I mientras que para el HTLV-2 se utilizan los cebadores SK43-II y SK44-II (Tabla 5). La mezcla de reacción para la segunda amplificación consiste de 5 µl de buffer 10x; 4µl de Cl<sub>2</sub>Mg 50mM; 1µl de dNTPs 10mM; 1µl del cebador (10µM) 0.25µl de Taq Pol 5U/µl. Para el gen *pol* del HTLV-1 los cebadores de la segunda reacción de PCR

son pol1.1 y pol3.1; y para HTLV-2 fueron pol1.2 y pol3.2. Para la segunda amplificación del gen *tax* del HTLV-1/2 los cebadores internos son comunes para ambos virus [164]. Las reacciones de amplificación se llevan a cabo en un termociclador (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer). La temperatura de apareamiento se calculó según la siguiente fórmula:  $2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$  y la ronda de ciclos fue la siguiente: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos (extensión de 2 seg por ciclo) con 1 minuto a 94°C y 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 72°C, con unos 7 minutos finales a 72°C. Como control interno de extracción de ADN se realiza una PCR para el gen de  $\beta$ -actina. Las muestras son consideradas como positivas al obtenerse amplificación de genes para cada tipo viral específico [156]. La nested PCR que se utiliza presenta una sensibilidad de 1 copia de ADN por cada  $10^5$  células para HTLV-1 y de 15 copias de ADN cada  $10^5$  células para HTLV-2.

**Tabla 5.** Pares de cebadores usados para la amplificación de *pol* y *tax* de HTLV-1 y HTLV-2.

**Primer ciclo**

Gen	Nombre	Posición	Secuencia	Referencia
<i>pol-1</i>	SK 110-I	4757-4778	CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G	[165]
	SK 111-I	4942-4919	GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT	
<i>tax-1</i>	SK 43-I	7358-7377	CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT	[164]
	SK 44-I	7516-7496	GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG	
<i>pol-2</i>	SK 110-II	4735- 4756	CCA TAC AAC CCC ACC AGC TCA G	[165]
	SK 111-II	4920- 4897	GTG GTG GAT TTG CCA TCG GGT TTT	
<i>tax-2</i>	SK 43-II	7248- 7267	TGG ATA CCC CGT CTA CGT GT	[164]
	SK 44-II	7406- 7368	AG CTG ACA ACG CGT CCA TCG	

### Segundo ciclo

Gen	Nombre	Posición	Secuencia	Referencia
<i>pol-1</i>	<i>pol</i> 1.1	4782-4805	TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC	[165]
	<i>pol</i> 3.1	4917-4894	TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG	
<i>tax-1</i>	IS 43/44	7264-7283	GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA	[164]
	IAS 43/44	7501-7485	CCA TCG ATG GGG TCC CA	
<i>pol-2</i>	<i>pol</i> 1.1	4782-4805	TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC	[165]
	<i>pol</i> 3.1	4917-4894	TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG	
<i>tax-2</i>	IS 43/44	7264-7283	GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA	[164]
	IAS 43/44	7501-7485	CCA TCG ATG GGG TCC CA	

El producto de PCR se siembra en un gel de agarosa 1% en buffer solución de tris- borato-EDTA (TBE) 1X, junto con marcadores de peso molecular de 100pb y se visualiza con luz ultravioleta (UV) por tinción con Bromuro de Etidio 0,5g/ml. Las muestras se corren 30 minutos a 100 volts. Para el caso de la  $\beta$ -actina se observa una banda de 523pb. Para el HTLV-1 se observan bandas de 198pb para el gen *pol* y de 159pb para el gen *tax*. En cuanto al HTLV-2, las bandas que se obtienen son de 138pb para *pol* y 128pb para *tax*.

**Carga proviral (CPV) de HTLV:** se cuantificó la CPV de HTLV-1 mediante real-time SYBR Green PCR. Los cebadores utilizados fueron los SK110-1 y SK111-1 correspondientes al gen *pol*. Se utilizaron además, los cebadores ALB-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') y ALB-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGT-3') para llevar a cabo una cuantificación en paralelo del gen de albúmina, cuyas mediciones permitieron la normalización de la cantidad de copias del gen *pol*. Las amplificaciones de ambos genes se llevó a cabo en reacciones separadas, en un equipo ABI Prism 7500 System (Applied Biosystems).

Para validar la especificidad de las amplificaciones, se utilizó la herramienta *melting curves*, que permite determinar la temperatura de desnaturalización de los productos obtenidos, agregando un paso adicional al ciclado. Para el análisis de datos se utilizó un método de cuantificación absoluta. Las curvas de calibrado se construyeron a partir de una muestra de concentración conocida del gen de interés; se realizaron diluciones seriadas 1/10 del stock de ADN extraído a partir de  $2 \times 10^6$  células MT2 (21,05ng/ $\mu$ l). Se normalizó la cantidad de ADN asumiendo la presencia de dos copias del gen albúmina y dos copias gen *pol* por cada célula; la línea celular MT2 posee 8 provirus defectivos integrados al cromosoma con solo dos copias completas del gen *pol* por célula [166]. Se estableció la siguiente relación: 240 ng de ADN genómico corresponde a 39.000 células [167]. Se incluyó una curva de calibrado tanto para el gen de interés, como para el gen normalizador en cada una de las corridas a realizar. Para todas ensayos, el límite de detección (LOD) fue de 3,4 copias de *pol*/reacción y 34,2 copias de albúmina/reacción; cuyos valores se ajustan a las guías MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), que indican que el LOD más sensible teóricamente posible es de 3 copias/reacción. Los valores obtenidos fueron expresados como copias de *pol*/célula. El análisis de datos se realizó mediante el software InfoStat, versión 2011.

**Secuenciación y análisis filogenético de la región LTR:** se amplificó la región LTR del HTLV-1 con los cebadores externos específicos 8200LA/3VEXT; y los cebadores internos 8200LA/3VINT, respectivamente (Tabla 6). El tamaño de los productos finales de amplificación fue de 459pb. Las condiciones de ciclado se muestran en la Tabla 7. Como controles HTLV-1 positivos se utilizaron: ADN extraído de la línea celular MT2 (productora de HTLV-1) en la mínima dilución positiva y muestras HTLV-1 positivas conocidas. Como controles negativos de utilizaron agua estéril, ADN de la línea celular H9 (no infectada por HTLV-1/2) y muestras negativas para HTLV-1 conocidas. La secuenciación se llevó a cabo utilizando una mezcla comercial (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Version 3.0 mixture, Applied Biosystems), que contiene los terminadores marcados, deoxinucleósidos trifosfato, AmpliTaq ADN Polimerasa,

pirofosfatasa, cloruro de magnesio y buffer. La mezcla de dNTPs incluye dITP en lugar de dGTP para minimizar la compresión de las bandas. Además utiliza dUTP en lugar de dTTP para mejorar la incorporación de los terminadores. Las secuencias se generaron en un secuenciador automático (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 6.** Pares de cebadores usados para la amplificación de un fragmento del LTR de HTLV-1.

**Primer ciclo**

Gen	Nombre	Posición	Secuencia	Referencia
<i>LTR-1</i>	8200LA	8196-8219	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	[168]
	3Vext	8759-8742	CGC AGT TCA GGA GGC ACC RM	

**Segundo ciclo**

Gen	Nombre	Posición	Secuencia	Referencia
<i>LTR-1</i>	8200LA	8196-8219	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	[168]
	3VINT	8724-8699	GAA CGC RAC TCA ACC GGC RYG GAT GG	

**Tabla 7.** Condiciones de ciclado para la PCR de secuenciación para HTLV-1 a partir de un fragmento del LTR.

N° de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96°C	5 minutos
24	96°C	10 segundos
	50°C	5 segundos
1	60°C	4 minutos
1	72°C	5 minutos

**Amplificación de los alelos HLA-A:** se realizó la tipificación de HLA clase I (A) mediante amplificaciones por PCR con cebadores específicos de secuencias de diferentes zonas donde existen polimorfismos diferenciales a partir de ADN genómico, para luego realizar la secuenciación de estos productos. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 8. La presencia de bandas se confirmó a través de electroforesis en gel de agarosa. Los exones 2 y 3 fueron amplificados en un único producto de 1000 pb, utilizando los cebadores 5AIn 1-46 y 3AIn3-66 [169].

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de HLA-A.

Nombre	Cebadores PCR (5´-3´)	Nombre	Cebadores secuenciación (5´-3´)
5Ain1-46	GAAACSGCCTCTGYGGGGAGAAGCAA	3Ain2-37	GGCCGTCCGTGGGGGATGAG
3Ain3-66	TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCTC	3Ain3-41	TGTGGGAGGCCAGCCCGGGAGA

**Secuenciación de los alelos de HLA-A clase I:** La secuenciación alélica de HLA se realizó en un secuenciador automático (Applied Biosystems DNA sequencer 3100), como ya ha sido descrito previamente.

## PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

**Datos epidemiológicos:** los datos clínico-demográficos y los resultados virológicos de las muestras con patologías analizadas en éste estudio fueron ingresados en una planilla electrónica Excel y posteriormente analizados mediante el software estadístico SPSS 19.0. Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando los siguientes tests (según correspondió en cada situación en particular, previo testeo de las condiciones de aplicación de cada uno de ellos): Test de Student (para varianzas estimadas como iguales o diferentes) o Wilcoxon Rank Sum test; Test Z para una muestra o Test binomial exacto; Test Chi<sup>2</sup> de Pearson o Test exacto de Fisher.

**Carga proviral:** el análisis de datos se realizó mediante el software InfoStat, versión 2011. Las diferencias entre los grupos se establecieron utilizando el U test de Mann-Whitney Wilcoxon, análisis no paramétrico. Se consideró hipótesis nula a

la inexistencia de diferencia significativa entre la CPV (copias de pol/célula) de muestras pacientes con ATLL y muestras de pacientes con HAM/TSP. Se realizó un análisis de correlación de Spearman (test no paramétrico) para estudiar la relación entre CPV y la edad de los individuos al momento de la obtención de la muestra. Los resultados se graficaron con GraphPad Prism, versión trial 6.03.

**Análisis filogenético de HTLV-1:** el porcentaje de similitud fue obtenido comparando las secuencias estudiadas con la secuencia prototipo pertenecientes a cada subtipo (test de Kruskal-Wallis). Las secuencias fueron examinadas con el programa BioEdit, alineadas con el algoritmo Clustal W y corregidas manualmente [170]. Los cálculos de distancia media y la reconstrucción filogenética por medio de neighbour joining (NJ) se realizaron utilizando el programa MEGA 6 para Windows [171].

**Tipificación de HLA-A:** los resultados obtenidos del análisis de HLA-A se incorporaron a una base de datos y el análisis estadístico para establecer asociaciones entre determinados polimorfismos de alelos de HLA-A descritos en la literatura, la presencia de una patología o los valores obtenidos de CPV se determinaron utilizando los siguientes tests (según correspondió en cada situación en particular, previo testeo de las condiciones de aplicación de cada uno de ellos): Test de Student (para varianzas estimadas como iguales o diferentes), Test Chi<sup>2</sup> de Pearson o Test exacto de Fisher, ANOVA de una vía o test de Kruskal Wallis.

# RESULTADOS

## 1. Características epidemio-demográficas de todos los casos procesados para diagnóstico de HTLV-1/2 por el grupo HTLV del INBIRS.

De inicio se procedió a organizar las planillas de datos de los diferentes años correspondientes a todos los individuos que fueron derivados desde bancos de sangre u otros servicios médicos o bien que hayan concurrido al INBIRS para el Diagnóstico de HTLV-1/2 entre Enero de 1998 y Diciembre de 2014 en una base única. A partir del análisis de ésta se calculó la existencia de un total de 2206 muestras procesadas y conservadas en el instituto.

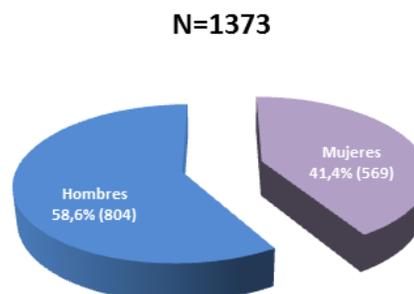
### **Características demográficas**

Dependiendo del año y procedencia de la muestra el registro de la información sobre los pacientes puede no ser completo para todas las variables analizadas (género, edad, población, provincia de origen). En la Tabla 9, se muestra el total de casos obtenidos para cada variable analizada.

**Tabla 9:** Características demográficas de la población estudiada.

(N=2206)	Género	Edad	Población	Procedencia de la muestra
Casos válidos	1373	1107	2120	2165
Casos sin datos	833	909	86	41

En cuanto a las características demográficas de la población estudiada, de 1373 individuos con información de género, el 58.6% (n=804) correspondían al género masculino (Figura 9).



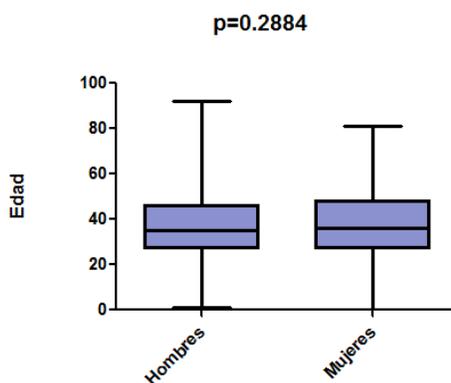
**Figura 9:** Distribución por género de los 1373 casos analizados.

De los 1373, se contaba con la información de edad en 1107 Casos. De ellos, el 41.01% (n=454) eran mujeres, con una mediana de edad de 36 años; mientras que el restante 58.99% fueron hombres (n=653) con una mediana de edad de 35 años (Tabla 10).

**Tabla 10:** Distribución por edad y género de casos procesados para diagnóstico de HTLV en el INBIRS.

(N=1107)	Edad (años)			
	Mínima	Máxima	Mediana	IC
Mujeres	0	81	36	(36.2-38.9)
Hombres	1	92	35	(35.6-37.7)

No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p: 0,2884$ ) con respecto a la edad distribuida por género de los casos que se incluyeron en el análisis (Figura 10).



**Figura 10:** Distribución por edad y género de los 1107 casos estudiados.

En cuanto a la procedencia de las 2165 muestras procesadas en el INBIRS para diagnóstico de la infección por HTLV-1/2 en relación al país, 2153 correspondían a individuos residentes de Argentina (9 de origen peruano de los cuales 4 resultaron HTLV-1 positivos, 3 seroindeterminados y 2 negativos por

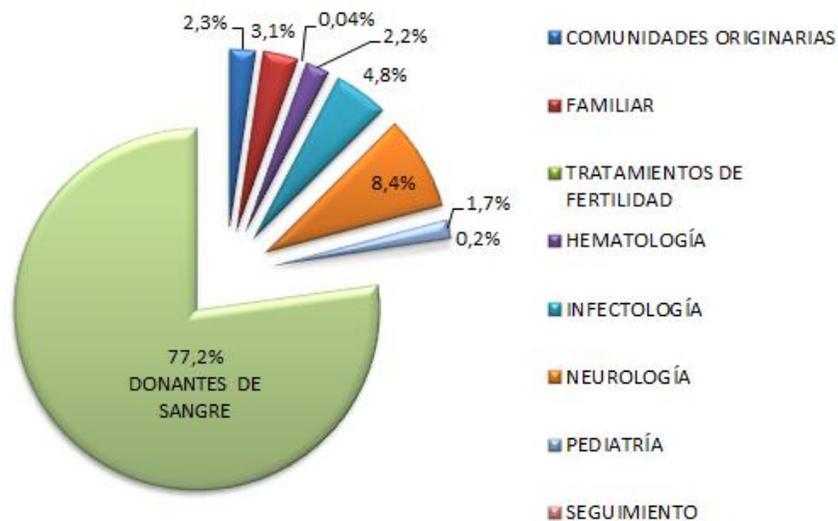
WB), mientras que 2 residían en Paraguay (HTLV-1 positivos) y 1 en Uruguay (seronegativo). De 41 casos no se obtuvieron datos.

De los casos pertenecientes a ciudadanos argentinos, el 35.4% provenían de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 15.8% de la provincia de Mendoza, 9.8% de la provincia de Buenos Aires, 8.7% de Santa Fe, 6.0% de Neuquén, 5.8% de la provincia de Corrientes y en menores porcentajes de las provincias de Chaco, Chubut, Córdoba, Entre Ríos Formosa, Jujuy, Misiones, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Cruz, Santiago del Estero, Tierra del Fuego y Tucumán (Tabla 11).

**Tabla 11:** Distribución por provincia de los 2162 casos procesados en el INBIRS para diagnóstico de HTLV-1/2.

PROVINCIA (N=2165)	FRECUENCIA	PORCENTAJE
CABA	779	35.4
MENDOZA	348	15.8
BUENOS AIRES	217	9.8
SANTA FE	191	8.7
NEUQUEN	133	6.0
CORRIENTES	128	5.8
MISIONES	104	4.7
JUJUY	52	2,4
ENTRE RIOS	41	1.9
RIO NEGRO	36	1.6
CHACO	25	1.1
SALTA	21	1.0
FORMOSA	16	0.7
CHUBUT	16	0.7
SANTIAGO DEL ESTERO	14	0.6
TIERRA DEL FUEGO	12	0.5
TUCUMAN	7	0.3
SANTA CRUZ	4	0.2
SAN JUAN	3	0.1
CORDOBA	3	0.1
SAN LUIS	1	0.0
EXTRANJEROS	14	0.5
SIN DATOS	41	1.9

En relación a los motivos por los que los individuos fueron estudiados en nuestro instituto para el diagnóstico de HTLV, el 77.2% (n=1640) de los 2124 casos analizados con información de derivación, fueron derivados por servicios de hemoterapia con un resultado de tamizaje reactivo como donante de sangre, 8.4% (n=178) por servicios de neurología, el 4.8% (n=103) de infectología (60 correspondían a pacientes HIV positivos, algunos DS o para diagnóstico diferencial de HAM/TSP), el 2.2% (n=46) por servicios de hematología (39 por diagnóstico diferencial de leucemias y 7 donantes de médula ósea) y, el 1.7% (n=37) de pediatría (por cuadro neurológico compatible con HAM/TSP, ser hijo de madre HTLV-1/2 positiva o presentar inmunodeficiencias) y 1 (0.04%) caso por tratamiento de fertilidad. Un 3.1% (n=66) eran familiares de individuos diagnosticados con HTLV-1/2, de las cuales 9 eran mujeres embarazadas, y 4 (0.2%) eran pacientes ya diagnosticados con HTLV-1/2 para su seguimiento. Además, el 2.2% (n=49) de los casos pertenecían a individuos originarios de Jujuy y Formosa estudiados por sospecha de infección (Figura 11).



**Figura 11:** Distribución por población de los 2124 casos con información sobre el motivo de diagnóstico de HTLV-1/2.

## **2. Frecuencia y características epidemiológicas de casos confirmados como HTLV-1 y HTLV-2 diagnosticados en el INBIRS**

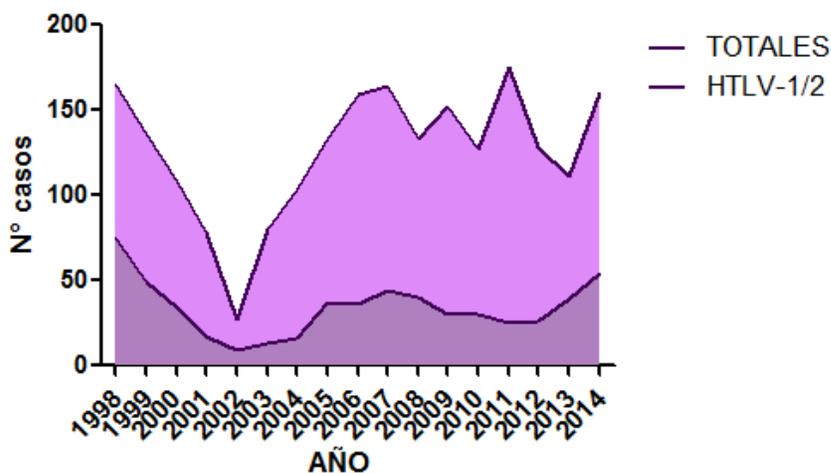
De las 2206 muestras totales analizadas, 1681 fueron derivaciones de servicios de hemoterapia correspondientes a donantes de sangre con pruebas de tamizaje reactivas y 525 correspondieron a individuos con sospecha de diagnóstico para la infección por HTLV-1/2. En el INBIRS, 1192 muestras presentaron un resultado reactivo por algún método de tamizaje y 1014 fueron no reactivas. De las 1192 muestras reactivas, 238 se confirmaron como negativas; 334 indeterminadas, 24 HTLV sin tipificar, 437 HTLV-1 positivas, 153 HTLV-2 positivas y 6 presentaron co-infección HTLV-1/HTLV-2, por WB.

Solamente se contaba con material de 66 muestras que resultaron Indeterminadas por WB y de 6 HTLV sin tipificar para diagnóstico molecular. De las 66; 2 fueron confirmadas como HTLV-1, 1 como HTLV-2 y 63 como negativas mientras que de los casos HTLV, 2 resultaron HTLV-1 por n-PCR. Las muestras restantes no fueron confirmadas por n-PCR por falta de material o bien porque al momento no se realizaba el diagnóstico molecular. En total se obtuvieron 301 casos negativos, 441 casos positivos para HTLV-1, 154 casos positivos para HTLV-2, 6 co-infecciones HTLV-1/HTLV-2, 22 casos de HTLV sin tipificar y 268 muestras indeterminadas por WB.

Teniendo en cuenta tanto los resultados serológicos como los moleculares, en la población estudiada la prevalencia final de infección por HTLV-1/2 fue de 28.2% (623/2206; IC85%: 26.3-30.1). Del total, 19.9% (441/2206; IC95%: 18.3-21.7) correspondió a infección por HTLV-1; 6.9% (154/2206; IC95%: 5.9-8.1) a HTLV-2, 1.0% (22/2206; IC95%: 0.6-1.4) a HTLV y 0.3% presentaban co-infección HTLV-1/2 (6/2206; IC95%: 0.03-0.5).

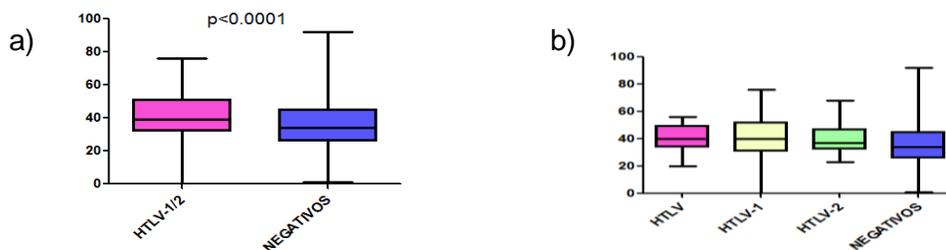
En la Figura 12 se muestra la variación del número de muestras recibidas en el INBIRS por año así como también la relación con las muestras que resultaron positivas para HTLV-1/2 en el período analizado. Se observa una menor cantidad de muestras significativas durante los años que el grupo HTLV suspendió el servicio (2001/02) ( $p=0.0297$ ; IC95%: 0.01-0.027) así como también se observó un

aumento significativo en el año 2011 ( $p=0.005$ ; IC95%: 0.007-0.038) y en el año 2014 ( $p=0.0026$ ; IC95%: -0.038-0.008). El total de muestras derivadas por servicios de hemoterapia también se mantuvo constante.



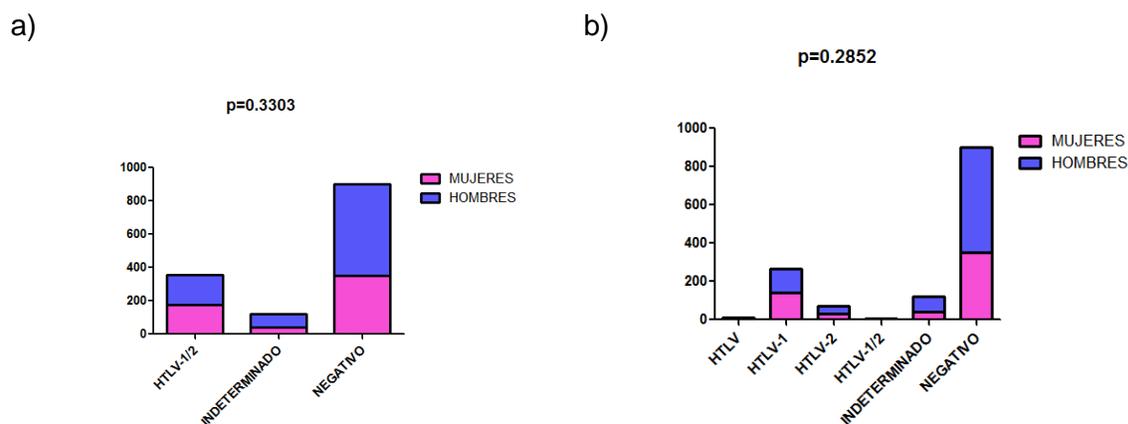
**Figura 12:** Variación del número de muestras recibidas en el INBIRS por año. Además de muestra la relación con el número de muestras que resultaron positivas para HTLV-1/2 en el período analizado.

En cuanto a los individuos HTLV-1/2 positivos, de los 623 casos, se poseía información de edad de 325 de ellos. La mediana de edad de los individuos HTLV-1 positivos fue de 41 años (IC95%: 39.17-42.69); para los HTLV-2 de 37 años (IC95%: 37.1-42.3); para los HTLV de 38 años (IC95%: 32.7-45.9), mientras que para los negativos fue de 34 años (IC95%: 35.0-36.9). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.0001$ ) entre las medianas de edad de los infectados por HTLV-1 con respecto a los no infectados (Figura 13).



**Figura 13:** Distribución por edad en relación al tipo de infección. a) Considerando a todos los individuos infectados como un solo grupo; b) Considerando todos los tipos de infección por separado. Los individuos co-infectados con HTLV-1 y HTLV-2 fueron incluidos en los grupos HTLV-1 y HTLV-2.

A su vez, la frecuencia de infección por HTLV-1/2 entre las mujeres fue de 50,1% (178/350) y entre los hombres de 49.9% (176/549); no habiendo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,3303$ ) en la proporción de infectados por HTLV-1/2 entre hombres y mujeres (Figura 14). Por lo tanto, no se observó asociación entre la infección por HTLV-1/2 y el género en nuestra población ( $p=0.0662$ ).



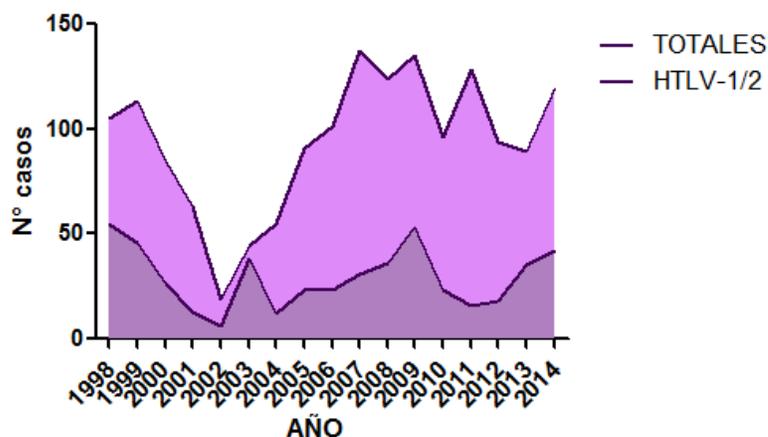
**Figura 14:** Distribución de casos HTLV según el tipo de infección y el género. a) Se consideraron todos los individuos seropositivos juntos. b) Distribución según el tipo de infección y género.

En relación a los individuos infectados por HTLV-1/2, de los 623 individuos totales, 483 habían sido derivados de bancos de sangre, 35 de servicios de neurología para un diagnóstico diferencial, 27 habían sido derivados de servicios de infectología (14 eran pacientes HIV positivos, 4 eran usuarios de drogas inyectables y los restantes eran donantes de sangre o bien pacientes para diagnóstico diferencial de HAM/TSP), 23 eran familiares de individuos infectados por HTLV-1/2 de las cuales 6 eran mujeres embarazadas, 18 provenían de servicios de hematología de los cuales 12 tenían un diagnóstico presuntivo de ATLL, 8 de niños nacidos de madres HTLV-1/2 positivas, 4 concurren al centro para su seguimiento de la infección por HTLV-1. Además, 8 provenían de individuos de comunidades originarias del norte de nuestro país (Jujuy y Formosa), y de los restantes 17 casos se desconoce el motivo de su derivación (Tabla 12).

**Tabla 12.** Distribución por tipo de derivación de 623 casos procesados en el INBIRS para diagnóstico de HTLV-1/2.

	HTLV-1	HTLV-2	HTLV-1/2	HTLV	TOTALES
<b>DONANTES DE SANGRE</b>	321	137	5	20	<b>483</b>
<b>NEUROLOGÍA</b>	32	2	-	1	<b>35</b>
<b>INFECTOLOGÍA</b>	24	1	1	1	<b>27</b>
<b>FAMILIARES</b>	18	5	-	-	<b>23</b>
<b>HEMATOLOGÍA</b>	18	-	-	-	<b>18</b>
<b>PEDIATRÍA</b>	7	1	-	-	<b>8</b>
<b>SEGUIMIENTO</b>	4	-	-	-	<b>4</b>
<b>DESCONOCIDO</b>	13	4	-	-	<b>17</b>
<b>COMUNIDADES ORIGINARIAS</b>	4	4	-	-	<b>8</b>
<b>TOTALES</b>	<b>441</b>	<b>154</b>	<b>6</b>	<b>22</b>	<b>623</b>

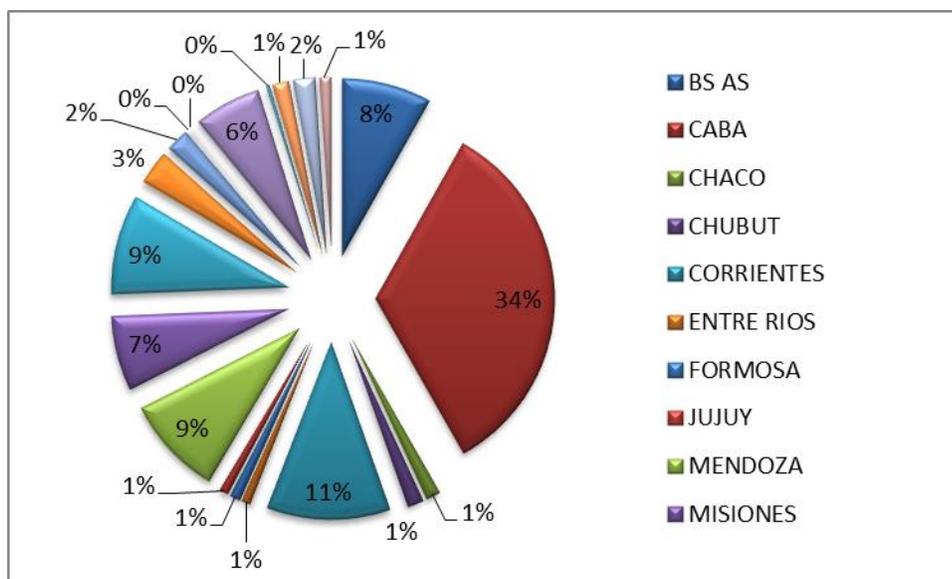
En la Figura 15 se muestra la variación del número de muestras de donantes de sangre a lo largo de los años estudiados y la relación con los casos positivos diagnosticados en el INBIRS.



**Figura 15:** Variación del número de muestras de donantes de sangre recibidas en el INBIRS por año. Además de muestra la relación con el número de muestras de ésta población que resultaron positivas para HTLV-1/2 en el período analizado.

La mayoría de los casos infectados correspondían a individuos residentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (N=204), luego a Corrientes (N=68), seguido por Neuquén (N=55) y Mendoza (N=55), provincia de Buenos Aires (N=49), Misiones (N=41), Santa Fé (N=37), Rio Negro (N=19), Salta (N=13) y con menores

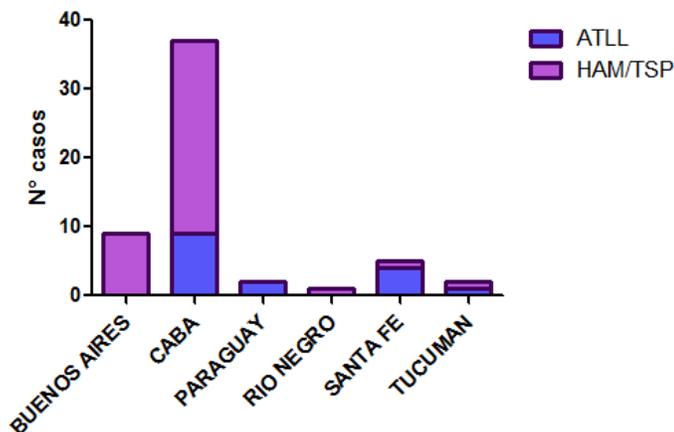
frecuencias en el resto de las provincias. En la Figura 16 se detalla la procedencia de los casos infectados distribuida por provincia.



**Figura 16:** Distribución por provincia de los casos infectados HTLV-1/2.

### 3. Prevalencia y características epidemiológicas de los casos con patologías asociadas al HTLV-1

En cuanto a la prevalencia de las enfermedades asociadas a la infección por HTLV-1, se han podido diagnosticar un total de 16 casos de ATLL con una prevalencia de 0.7% (IC95%: 0.349-1.102) y 40 casos de HAM/TSP con una prevalencia de 1.8% (IC95%: 1.234-2.393). En la Figura 17 se detalla la procedencia (país/provincia) de los individuos que presentaron patologías asociadas al HTLV-1, distribuidas según ATLL y HAM/TSP.

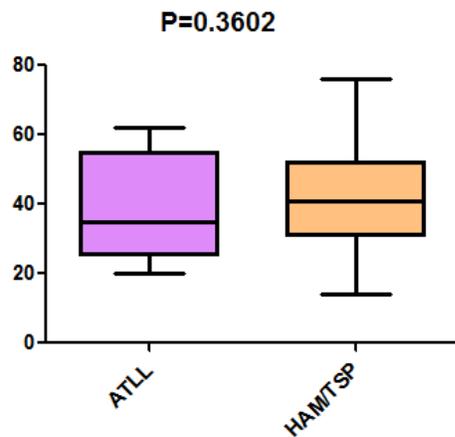


**Figura 17:** Procedencia de los individuos que presentaron las patologías asociadas a la infección por HTLV-1. ATLL: Leucemia/Linfoma a células T del Adulto, HAM/TSP: Mielopatía Asociada al HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical.

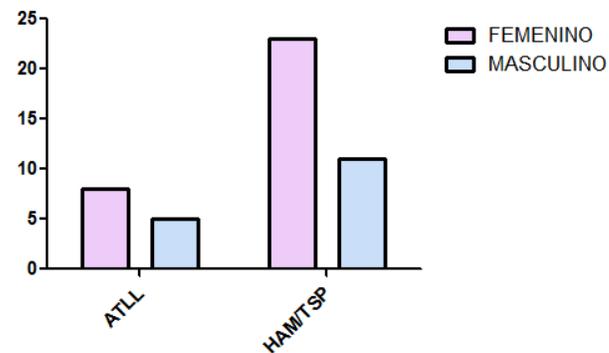
De los 9 casos de ATLL de CABA, 4 de ellos reportaron alguna relación con áreas endémicas para la infección por HTLV-1/2 (haber nacido en Formosa, Jujuy, o bien tener padres del norte del país como Formosa, Tucumán o Santiago del Estero). Además, 4 fueron derivados de Santa Fé, 1 de Tucumán (cuya madre era de Salta) y 2 de Paraguay. En cuanto a los casos de HAM/TSP, de los 28 reportados en CABA 7 eran nacidos en Perú, 2 en Paraguay, 1 Colombia, 1 nacido en Chaco y uno era hijo de Paraguayos. De los 9 de provincia de Buenos Aires, 2 reportaron haber nacido en Perú, y uno en Bolivia. De los 3 casos restantes 1 era de Río Negro, uno de Santa Fe y uno de Tucumán.

No se observaron diferencias significativas respecto de las medianas de edad entre ambos grupos (Figura 18) ni en relación al género tanto para ATLL ( $p=0.2636$ ; IC95%:  $-0.137-0.671$ ) como para HAM/TSP ( $p=0.4451$ ; IC95%:  $-0.145-0.395$ )

a)



b)



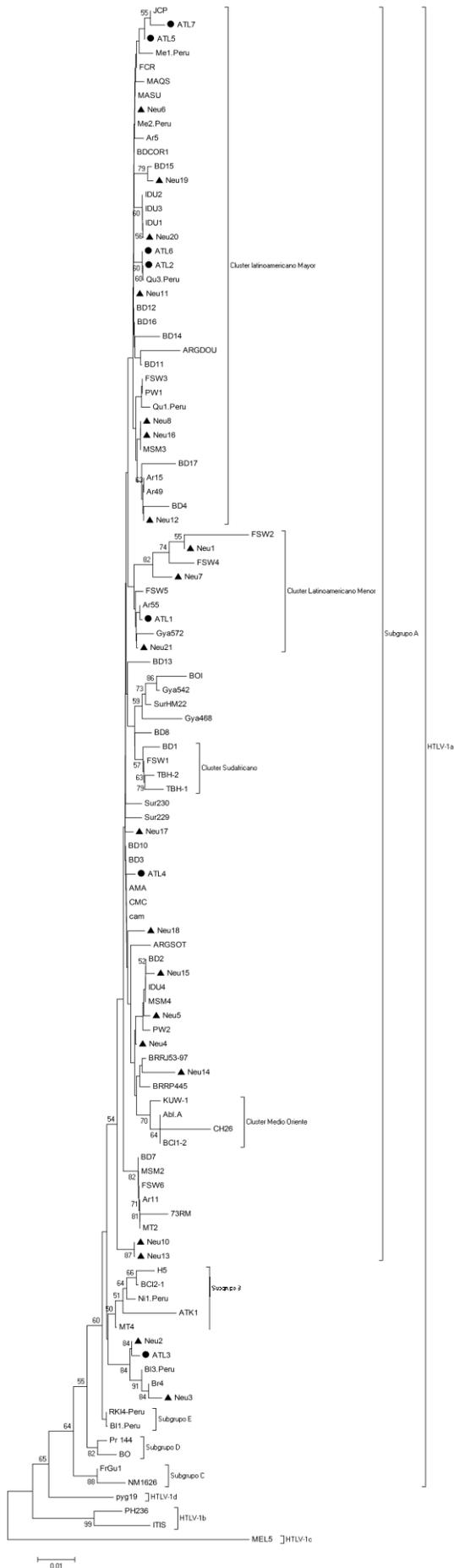
**Figura 18:** Medianas de edad y género para individuos con ATLL Y HAM/TSP. a) Comparación de medianas de edad para los individuos diagnosticados con patologías asociadas a la infección por HTLV-1. b) Cantidad de casos con ATLL y HAM/TSP agrupados por género. ATLL: Leucemia/Linfoma a células T del Adulto, HAM/TSP: Mielopatía Asociada al HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical.

#### 4. Análisis filogenético las cepas HTLV-1 detectadas en individuos con patologías asociadas a la infección

De las 56 muestras provenientes de individuos HTLV-1 positivos con patologías, se incluyeron un total de 27 muestras para el análisis filogenético ya que no se contaba con material de las restantes (20 pertenecían a individuos con HAM/TSP y 7 con ATLL). Para ello, se amplificó y secuenció la región LTR de cada una y se las analizaron junto con 98 cepas referentes disponibles en el GeneBank elegidas por su proveniencia geográfica (países Sudamericanos con altas tasas de migración a Argentina), cepas previamente reportadas en Argentina y las representativas de los subtipos y subgrupos conocidos, conformando una matriz optimizada de 459pb. La matriz se analizó por NJ, obteniendo los resultados que a continuación se detallan (Figura 19). La secuencia de referencia Mel 5, de origen melanésico y subtipo c, fue utilizada como grupo externo. El análisis filogenético permitió detectar los subtipos a-d y dentro del subtipo a (Cosmopolita) se distinguieron los 5 subgrupos A-E. Como se puede observar en la figura, el subtipo cosmopolita HTLV-1 a se agrupó separado de los subtipos

HTLV-1 b, c, y d (valor de bootstrap: 65%). Dentro del subtipo Cosmopolita, se distinguieron cinco subgrupos, como fue descrito previamente. Si bien todos ellos han sido consistentemente separados, solo dos subgrupos, el subgrupo C (África del Oeste/ Caribe) (valor de bootstrap: 88%) y el subgrupo D (África del norte) (valor de bootstrap: 82%), demostraron buen soporte con valores superiores al 75%.

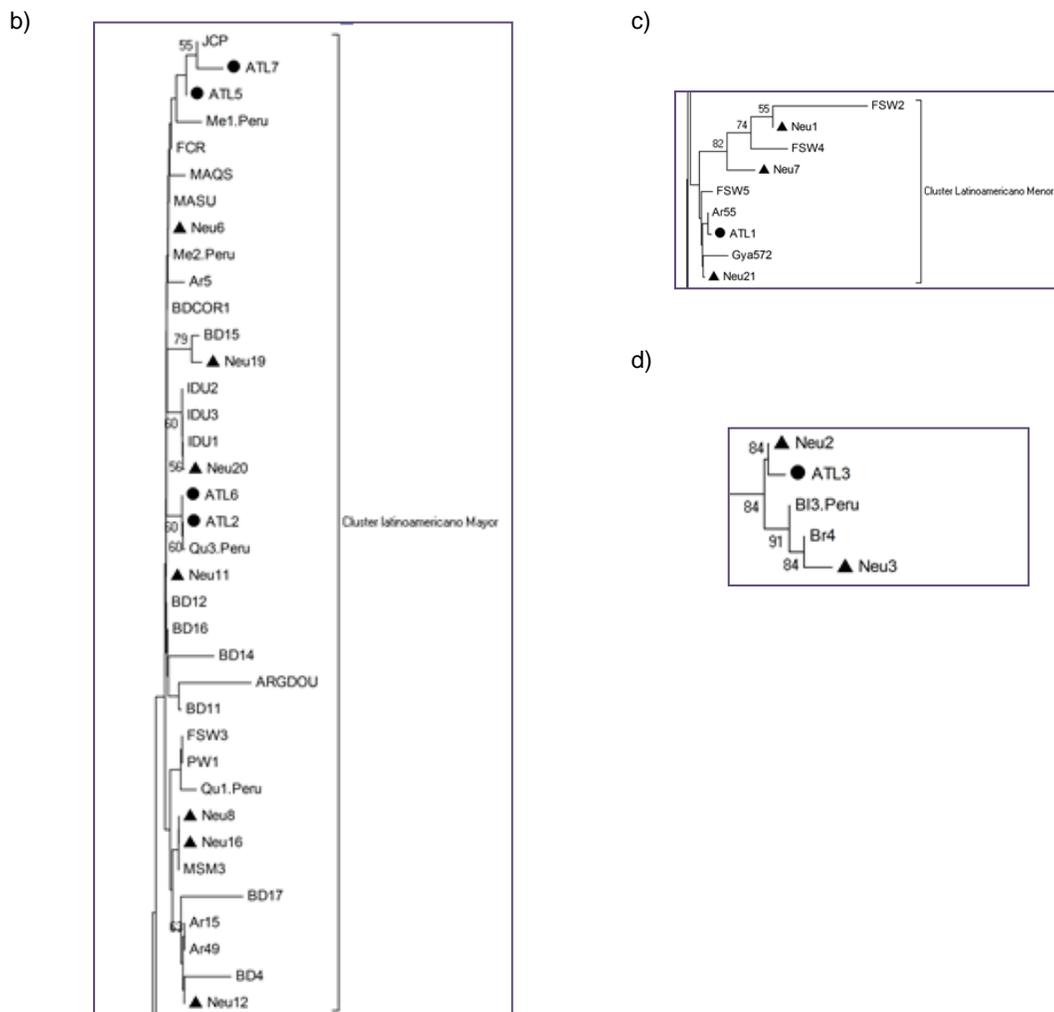
Las 27 secuencias HTLV-1 se incluyeron dentro del subtipo Cosmopolita (a) (65% *bootstrap*), y 24 de ellas clasificaron como subgrupo Transcontinental (A). Dentro de este subgrupo, 15 secuencias agruparon en 2 *clusters* Latinoamericanos previamente descritos: 11 en el **Clado Latinoamericano Mayor** (que incluyó referencias de Amerindios de Argentina, Perú y Brasil) y 4 en el **Clado Latinoamericano Menor** (con referencias de nativos de Surinam, Guyana, Perú y Argentina). Las 9 secuencias restantes se distribuyeron a lo largo del árbol sin incluirse en un clado particular. Por fuera del subgrupo Transcontinental, una secuencia de una mujer de Jujuy con ATLL (ATL3) agrupó con dos secuencias (Neu2 y Neu3) provenientes de mujeres peruanas con HAM/TSP y formaron un grupo monofilético el cual a su vez incluyó a una referencia de Brasil (Br4) y otra de Perú (Bl3), ambas provenientes de individuos descendientes de raza negra. Dicho clado, designado previamente por nuestro grupo como **Clado divergente** y publicado en 2008, clasificó dentro del subgrupo B del Cosmopolita (NJ, 84% *bootstrap*) (Figura 19) [172].



**Figura 19.** a) Árbol de Neighbour Joining (NJ) de 98 secuencias de un fragmento de 490 pb del LTR del HTLV-1. Las secuencias correspondientes a las muestras analizadas se muestran con ● (ATLL) y ▲ (HAM/TSP). La secuencia MEL5 se utilizó como outgroup. Los números en las ramas indican el valor de soporte de cada nodo. El origen geográfico de las secuencias de referencia incluidas en el análisis de arriba hacia abajo son los siguientes: JCP (Brasil), ATL7 (Argentina), ATL5 (Argentina), Me1.Peru (Perú), FCR (Brasil), MAQS (Brasil), MASU (Brasil), Neu6 (Argentina), Me2.Peru (Perú), Ar5 (Argentina), BDCOR1 (Argentina), BD15 (Argentina), Neu19 (Argentina), IDU1-3 (Argentina), Neu20 (Argentina), ATL6 (Argentina), ATL2 (Argentina), Qu3.Peru (Perú), Neu11 (Argentina), BD12 (Argentina), BD16 (Argentina), BD14 (Argentina), ARGDOU (Argentina), BD11 (Argentina), FSW3 (Argentina), PW1 (Argentina), Qu1.Peru (Perú), Neu8 (Argentina), Neu16 (Argentina), MSM3 (Argentina), BD17 (Argentina), Ar15 (Argentina), Ar49 (Argentina), BD4 (Argentina), Neu12 (Argentina), FSW2 (Argentina), Neu1 (Argentina), FSW4 (Argentina), Neu7 (Argentina), FSW5 (Argentina), Ar55 (Argentina), ATL1 (Argentina), Gya572 (Guyana), Neu21 (Argentina), BD13 (Argentina), BOI (Francia), Gya468 (Guyana), BD8 (Argentina), BD1 (Argentina), FSW1 (Argentina), TBH-2 (Sudáfrica), TBH-1 (Sudáfrica), Sur230 (Surinam), Sur229 (Surinam), Neu17 (Argentina), BD10 (Argentina), BD3 (Argentina), ATL4 (Argentina), AMA (Brasil), CMC (Taiwán), cam (Guayana Francesa), Neu18 (Argentina), ARGSTOT (Argentina), BD2 (Argentina), Neu15 (Argentina), IDU4 (Argentina), MSM4 (Argentina), Neu5 (Argentina), Neu4 (Argentina), PW2 (Argentina), Neu3 (Argentina), BRRJ53-97 (Argentina), Neu14 (Argentina), BRRP445 (Argentina), KUW-1 (Argentina), Abi.A (Argentina), CH26 (Argentina), BC1-2 (Argentina), BD7 (Argentina), MSM2 (Argentina), FSW6 (Argentina), Ar11 (Argentina), 73RM (Argentina), MT2 (Argentina), Neu10 (Argentina), Neu13 (Argentina), H5 (Argentina), BC12-1 (Argentina), N11.Peru (Perú), ATK1 (Argentina), MT4 (Argentina), Neu2 (Argentina), ATL3 (Argentina), B13.Peru (Perú), Bh4 (Argentina), Neu3 (Argentina), RKH4.Peru (Perú), Subgrupo E (Argentina), B11.Peru (Perú), Subgrupo D (Argentina), Pr 144 (Argentina), BO (Argentina), FrGu1 (Argentina), NM1626 (Argentina), Subgrupo C (Argentina), pyg19 (Argentina), HTLV-1d (Argentina), PH236 (Argentina), HTLV-1b (Argentina), ITS (Argentina), MEL5 (HTLV-1c) (Argentina).

(Argentina), PW2 (Argentina), Neu4 (Argentina), BRRJ53-97 (Brasil), Neu14 (Argentina), BRRP445 (Brasil), KUW-1 (Kuwait), Abl.A (Sudáfrica), CH26 (Chile), BCI1-2 (Columbia Británica), BD7 (Argentina), MSM2 (Argentina), FSW6 (Argentina), Ar11 (Argentina), 73RM (USA), MT2 (Japón), Neu10 (Argentina), Neu13 (Argentina), H5 (Japón), BCI2-1 (Canadá), Ni1.Peru (Perú), ATK-1 (Japón), MT4 (Francia), ATLYS (Japón), Neu2 (Argentina), ATL3 (Argentina), BI3.Peru (Perú), Br4 (Brasil), Neu3 (Argentina), RKI4.Peru (Perú), BI1.Peru (Perú), Pr144 (Marruecos), BO (Argelia), FrGu1 (Guayana Francesa), NM1626.lac (Guayana Francesa), pyg19 (África Central), PH236 (Gabón), ITIS (República Democrática del Congo), MEL5 (Islas Salomón).

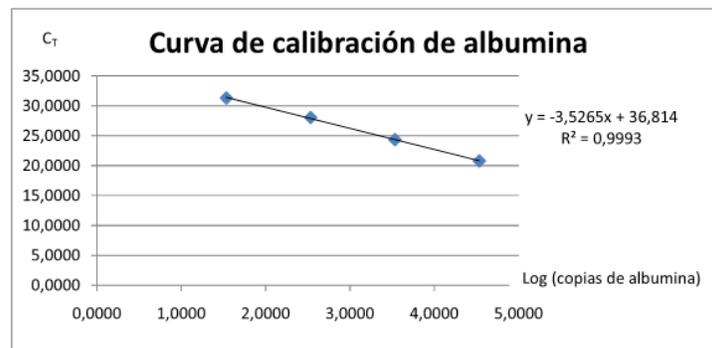
Sub-árboles de Neighbour Joining (NJ) con las secuencias de un fragmento de 490 pb del LTR del HTLV-1. Las secuencias correspondientes a las muestras analizadas se muestran con ● (ATL) y ▲ (HAM/TSP), **b)** muestras analizadas que agruparon dentro del cluster Latinoamericano mayor, **c)** muestras que agruparon en el Cluster Latinoamericano menor, **d)** muestra ATL3 que agrupó junto a otras secuencias en el subtipo Cosmopolita, subgrupo B.



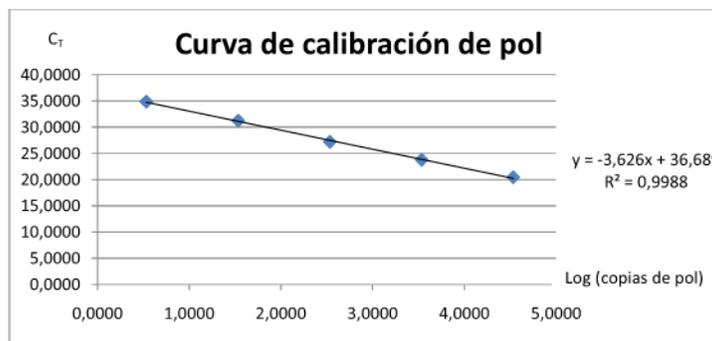
## 5. Niveles de carga proviral de pacientes con patologías asociada al HTLV-1

Se determinó la carga proviral (CPV) de HTLV-1 mediante el método de cuantificación PCR en tiempo real (SYBR Green) en las 29 muestras provenientes de individuos con patologías, 7 correspondientes a ATLL y 22 a HAM/TSP. En todas las corridas realizadas se incluyó una curva de calibrado tanto para el gen de interés (*pol* de HTLV-1), como para el gel normalizador (albúmina) (Figura 20). De esta manera, para cada ensayo existe una ecuación distinta que permite establecer una relación entre el CT (ciclo umbral) obtenido y la cantidad de copias del gen de interés. La determinación de CPV se expresó como copias de HTLV-1 cada 100 células mononucleares de sangre periférica.

a)



b)



**Figura 20:** Curva de calibración con diluciones 1/10 de un cultivo de células MT-2 infectadas con HTLV-1. a) Curva de calibración para el gen celular de albúmina. b) Curva de calibración para el gen viral *pol* de HTLV-1.

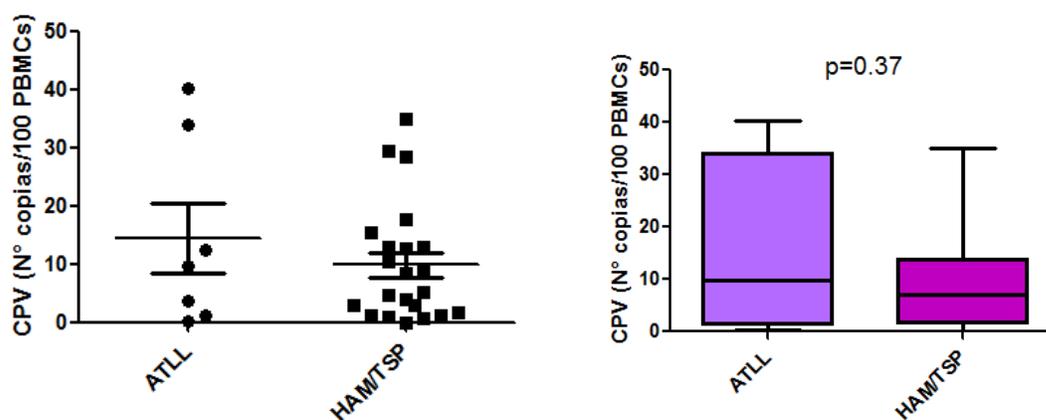
En la Tabla 13 se detallan los valores obtenidos de CPV para todas las muestras analizadas que fueron agrupadas según la patología asociada; ATLL o HAM/TSP.

**Tabla 13.** Datos demográficos y valores de carga proviral (CPV) para cada una de las muestras pertenecientes a pacientes con patologías asociadas a la infección por HTLV-1.

MUESTRA	CPV	PATOLOGÍA	EDAD	GENERO	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	ANTECEDENTES DE RIESGO
ATL1	1,30	ATLL Linfoma	48	FEMENINO	CABA	Sin datos
ATL2	12,49	ATLL Leucemia	67	FEMENINO	CABA	Sin datos
ATL3	3,73	ATLL Linfoma	29	FEMENINO	CABA	Sin datos
ATL4	33,98	ATLL Leucemia	53	MASCULINO	CABA	Padre tucumano y madre santiagueña
ATL5	9,87	ATLL Leucemia	21	MASCULINO	SANTA FE	Sin datos
ATL6	40,20	ATLL Leucemia	66	FEMENINO	CABA	Tucumana
ATL7	0,34	ATLL Linfoma	25	MASCULINO	CABA	Sin datos
Neu1	13,08	HAM/TSP	31	MASCULINO	CABA	Madre Paraguaya
Neu2	3,12	HAM/TSP	25	FEMENINO	CABA	Peruana
Neu3	13,09	HAM/TSP	41	MASCULINO	CABA	Sin datos
Neu4	1,67	HAM/TSP	67	FEMENINO	CHUBUT	Sin datos
Neu5	15,53	HAM/TSP	55	MASCULINO	Sin datos	Sin datos
Neu6	1,01	HAM/TSP	40	FEMENINO	CABA	Madre y abuela Peruanas con HAM/TSP
Neu7	12,86	HAM/TSP	61	FEMENINO	CABA	Peruana y madre con HAM/TSP
Neu8	1,35	HAM/TSP	50	MASCULINO	BUENOS AIRES	Sin datos
Neu9	0,71	HAM/TSP	43	FEMENINO	CABA	Madre fallecida por HTLV-1.
Neu10	29,54	HAM/TSP	56	FEMENINO	Sin datos	Sin datos
Neu11	0,12	HAM/TSP	19	MASCULINO	CABA	Peruano
Neu12	10,45	HAM/TSP	71	FEMENINO	CABA	Sin datos
Neu13	17,91	HAM/TSP	37	FEMENINO	CABA	Madre fallecida por leucemia
Neu14	28,46	HAM/TSP	Sin datos	Sin datos	CABA	Sin datos
Neu15	1,28	HAM/TSP	37	FEMENINO	CABA	HIV/HCV positiva
Neu16	4,78	HAM/TSP	51	FEMENINO	BUENOS AIRES	Sin datos
Neu17	3,12	HAM/TSP	27	FEMENINO	CABA	Sin datos
Neu18	5,39	HAM/TSP	65	MASCULINO	CABA	Peruano con tuberculosis
Neu19	8,57	HAM/TSP	52	FEMENINO	CABA	Sin datos
Neu20	8,91	HAM/TSP	14	FEMENINO	CABA	Chubut
Neu21	35,10	HAM/TSP	52	MASCULINO	CABA	Sin datos
Neu22	4,03	HAM/TSP	49	MASCULINO	CABA	Sin datos

CPV: carga proviral (N° copias/100 PBMCs), ATLL: Leucemia/linfoma a células T del Adulto HAM/TSP Mielopatía asociada al HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical.

Se construyó un gráfico a partir de los valores de CPV obtenidos para todos los individuos con patología. Como se observa en la Figura 21, existe una alta dispersión entre la CPV de cada muestra, por lo que la comparación entre ambos grupos se realizó comparando las medianas, junto con el desvío estándar en cada caso (Tabla 14). No existe una diferencia significativa entre el valor de CPV de muestras de pacientes con ATLL y de aquellos con HAM/TSP. Se realizó un análisis de correlación para determinar si existe alguna relación entre estas variables, pero dicha relación no pudo confirmarse ( $p=0,36$ ).



**Figura 21:** Valores de carga proviral para individuos con ATLL y HAM/TSP. a) Gráfico de dispersión; el valor de la media para cada grupo se representa con una línea recta. b) Gráfico de barras: mediana y desvío estándar de los grupos según la patología. No se observan diferencias significativas entre los valores de cada grupo ( $p=0.37$ ).

Las tres muestras con mayor CPV pertenecieron a 2 pacientes con ATLL y uno con HAM/TSP.

**Tabla 14:** Parámetros estadísticos de los dos grupos de patologías asociados al HTLV-1.

MUESTRA	ATLL	HAM/TSP
N	7	22
Media	14.55	10.00
Mediana	9.87	6.98
Desvío Estándar	16.10	10.09
Valor p	0.37	

## 6. Alelos de HLA relacionados con susceptibilidad y/o protección para HAM/TSP o ATLL en pacientes de Argentina

De las 29 muestras estudiadas, 7 no pudieron ser procesadas con los programas en línea utilizados para la tipificación de HLA-A basada en secuenciación. En las 22 muestras analizadas, se observaron 8 polimorfismos de HLA-A que se detallan en orden de frecuencia: A\*02, A\*33, A\*31, A\*29, A\*11, A\*68, A\*23 y A\*24 (Tabla 15).

**Tabla 15:** Descripción de los valores de carga proviral (CPV) y polimorfismos de HLA-A de las muestras provenientes de individuos con patologías del INBIRS.

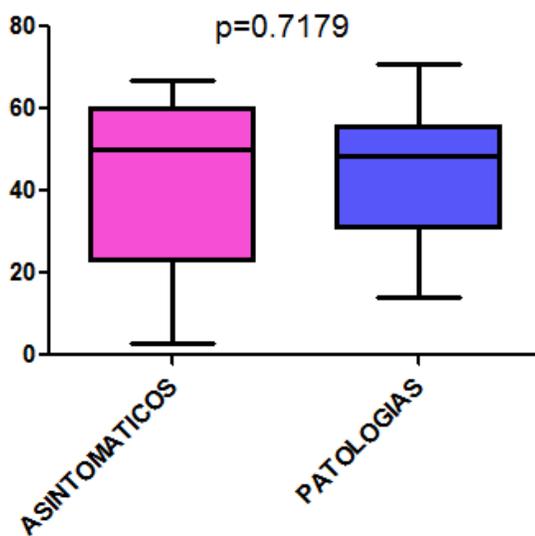
MUESTRA	CPV	PATOLOGÍA	HLA-A
ATL1	1,30	ATLL Linfoma	A*68-A*68
ATL2	12,49	ATLL Leucemia	A*02-A*02
ATL3	3,73	ATLL Linfoma	SD
ATL4	33,98	ATLL Leucemia	A*31-A*31
ATL5	9,87	ATLL Leucemia	SD
ATL6	40,20	ATLL Leucemia	A*33-A*33
ATL7	0,34	ATLL Linfoma	A*23-A*24
Neu1	13,08	HAM/TSP	SD
Neu2	3,12	HAM/TSP	A*29-A*29
Neu3	13,09	HAM/TSP	SD
Neu4	1,67	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu5	15,53	HAM/TSP	A*29-A*29
Neu6	1,01	HAM/TSP	SD
Neu7	12,86	HAM/TSP	A*31-A*31
Neu8	1,35	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu9	0,71	HAM/TSP	A*33-A*33
Neu10	29,54	HAM/TSP	A*33-A*33
Neu11	0,12	HAM/TSP	SD
Neu12	10,45	HAM/TSP	A*31-X
Neu13	17,91	HAM/TSP	SD
Neu14	28,46	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu15	1,28	HAM/TSP	A*29-X
Neu16	4,78	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu17	3,12	HAM/TSP	A*33-A*33
Neu18	5,39	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu19	8,57	HAM/TSP	A*02-A*02
Neu20	8,91	HAM/TSP	A*02-X
Neu21	35,10	HAM/TSP	A*31-A*31
Neu22	4,03	HAM/TSP	A*11-A*11

Al realizar el análisis según la patología de los individuos se observaron 6 polimorfismos en los 5 pacientes con ATL (A\*02, A\*23, A\*24, A\*31, A\*33 y A\*68),

mientras que en los 17 pacientes con HAM/TSP se observaron solo 5 (A\*02, A\*11, A\*29, A\*31 y A\*33). Los alelos A\*23, A\*24 y A\*68 se observaron únicamente en los individuos con ATL, mientras que los alelos A\*11 y A\*29 en aquellos con HAM/TSP.

Para los HLA-A\*02, A\*31 y A\*33, presentes tanto en individuos con ATL como en individuos con HAM/TSP, no se observaron diferencias significativas entre los 2 grupos siendo los valores de  $p=0.38$  (IC95%: -0.588,0.149),  $p=0.84$  (IC95%: -0.307,0.385) y  $p=0.36$  (IC95%: -0.344,0.357), respectivamente. En individuos con HAM/TSP, el alelo HLA-A\*02 se observó con mayor frecuencia, seguido por el alelo A\*33, sin diferencia significativa entre ambos ( $p=0.09$ ; IC95%: -0.029,0.481).

En cuanto al análisis de individuos asintomáticos infectados por HTLV-1, se analizaron un total de 19 muestras (Tabla 13). Al comparar las medianas de edad de este grupo con la de individuos con patologías, no se observaron diferencias significativas ( $p=0.7179$ , IC95%:-13.14-9.128) (Figura 22).



**Figura 22:** Comparación de medianas de edad de individuos asintomáticos y diagnosticados con patologías asociadas a la infección por HTLV-1.

En los individuos asintomáticos infectados por HTLV-1, se observaron 10 polimorfismos de HLA-A siendo en orden de frecuencia los siguientes: A\*02

(n=26), A\*03 (n=2), A\*24 (n=2), A\*29 (n=2), A\*01 (n=1), A\*23 (n=1), A\*30 (n=1), A\*31 (n=1), A\*33 (n=1), y A\*68 (n=1). En la Tabla 16 se detalla la procedencia de la muestra, la edad y los polimorfismos observados en el grupo de individuos asintomáticos con infección por HTLV-1.

**Tabla 16:** Descripción de las características epidemiológicas y los polimorfismos de HLA-A de las muestras provenientes de individuos asintomáticos con infección por HTLV-1.

MUESTRA	ORIGEN DE LA MUESTRA	EDAD	HLA-A
AS1	CABA	51	A*02-A*03
AS2	JUJUY	62	A*02-A*02
AS3	JUJUY	48	A*02-A*02
AS4	JUJUY	59	A*02-A*02
AS5	JUJUY	63	A*02-A*02
AS6	JUJUY	52	A*29-A*33
AS7	JUJUY	50	A*02-A*02
AS8	JUJUY	29	A*02-A*24
AS9	JUJUY	19	A*02-A*02
AS10	CABA	39	A*02-A*02
AS11	CABA	SD	A*02-A*03
AS12	MISIONES	SD	A*24-A*68
AS13	MISIONES	SD	A*02-A*23
AS14	CABA	67	A*02-A*02
AS15	NEUQUEN	SD	A*02-A*31
AS16	BUENOS AIRES	23	A*02-A*02
AS17	BUENOS AIRES	SD	A*02-A*02
AS18	CABA	21	A*02-A*29
AS19	CABA	60	A*01-A*30

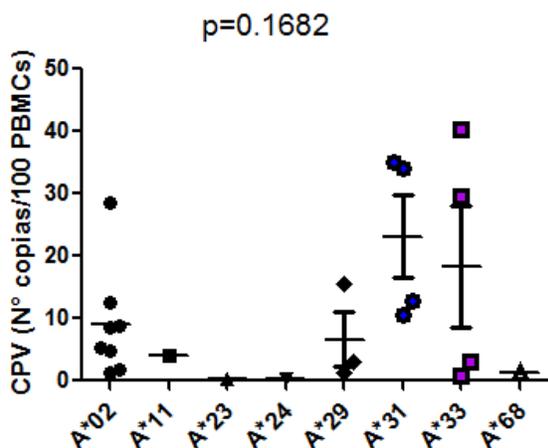
Al comparar las frecuencias de los polimorfismos presentes en el grupo de individuos asintomáticos y con patologías, se observó que el alelo A\*02 resultó ser más frecuente en asintomáticos ( $p=0.0092$ ; IC95%: 0.084-0.0520) mientras que el A\*33 ( $p=0.045$ ; IC95%: 0.012-0.326) en individuos con patologías, con diferencia significativas.

Para el análisis de los valores de carga proviral y su asociación con los diferentes polimorfismos de HLA-A, en la Tabla 17 se detallan los resultados obtenidos divididos por alelo presente en individuos con patologías asociadas a la infección por HTLV-1.

**Tabla 17:** Valores de carga proviral (N° copias de gen *pol*/100 células) distribuidos por alelos de HLA-A presentes en individuos con patologías asociadas al HTLV-1.

ALELO	CPV (N° copias <i>pol</i> /100 CMSP)	Media ± Error estándar de la media
A*02	1.67 28.46 1.35 4.78 12.49 5.39 8.57 8.91	8.952±3.088
A*11	4.03	-
A*23	0.34	-
A*24	0.34	-
A*29	3.12 15.53 1.28	6.643±4.475
A*31	10.45 33.98 35.10 12.86	23.10±6.629
A*33	29.54 3.12 0.71 40.20	18.39±9.771
A*68	1.30	-

En la Figura 23, se detallan los valores de CPV obtenidos para cada alelo, sus medianas y el valor de p del análisis de ANOVA de una vía, donde no se observan diferencias significativas.



**Figura 23:** Valores de carga proviral para los distintos alelos de HLA-A presentes en individuos con patologías asociadas a la infección por HTLV-1.

Al realizar el análisis solo entre pares de alelos, se observó una diferencia significativa de los valores de CPV entre el alelo A\*31 y el A\*02 ( $p=0.0488$ ; IC95%: 0.088-28.20), siendo superior para A\*31.

# **DISCUSION**

Los HTLVs son retrovirus humanos que se encuentran globalmente diseminados e infectan aproximadamente 25 millones de personas. La infección se caracteriza por presentar áreas naturalmente endémicas con distintos niveles de prevalencia, focos de microendemicidad, y una restricción étnico/geográfica bien definida.

Argentina, similar a otros países sudamericanos, tiene áreas endémicas con una restricción étnica-geográfica para la infección que circunscribe al HTLV-1 a la familia Aymará (*Kollas*) de las tierras altas precordilleranas de Jujuy y Salta; y al HTLV-2 a la familia Mataco-Guaycurú de las zonas bajas de Formosa, Chaco y este de Salta. En la región del noroeste además, como era lógico de esperar se han reportado focos endémicos de ambas patologías asociadas al HTLV-1, la HAM/TSP y la ATLL, respectivamente. A excepción de estas áreas, ambos virus, HTLV-1 y HTLV-2 han sido detectados en distintas poblaciones, como la de donantes de sangre y mujeres embarazadas con cifras de prevalencias bajas (0,01% a 0,07%) similares a la de países no endémicos. En grupos de riesgo las cifras generalmente alcanzan valores mayores y varían dependiendo de la población, región y año de estudio.

En el 2005, la detección de anticuerpos anti-HTLV-1/2 por técnicas de tamizaje devino un procedimiento obligatorio en los donantes de sangre; sin embargo no lo es brindar un resultado confirmatorio, y hasta el presente la infección por HTLV no ha sido incluido en ningún programa nacional del Ministerio de Salud que considere la implementación de una vigilancia integral. De todos modos, la mayoría de los servicios de hemoterapia intentan brindar un resultado final, ya sea porque realizan la confirmación o porque derivan la muestra para la misma a un centro de referencia. Esta situación ha llevado a que algunos laboratorios en el país sean referentes, para brindar un diagnóstico serológico y/o molecular, como es el caso del grupo HTLV del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), además de ofrecer un servicio asistencial integral y sin cargo.

El “Grupo HTLV de Medicina Traslacional” del INBIRS es referente nacional en HTLV para el Plan Nacional de Sangre (PNS) y la Red de Laboratorios de la

Administración Nacional de Laboratorios de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” del Ministerio de Salud desde hace años. Ha ofrecido el diagnóstico de HTLV desde 1993 y ha recibido muestras derivadas de bancos de sangre y servicios hospitalarios de la red pública y privada, fluctuando en cantidad y lugar de origen (provincias), dependiendo del año y los programas de salud involucrados (PNS, Programa de Retrovirus y SIDA).

En base a estos antecedentes el objetivo general de esta tesis de maestría fue aportar mayores conocimientos sobre la infección por HTLV-1/2 en Argentina. Para ello se planteó como primer objetivo realizar un estudio observacional de los casos estudiados por el Grupo HTLV del INBIRS correspondientes a individuos que requirieron por distintos motivos el diagnóstico de HTLV-1/2 entre enero de 1998 y diciembre de 2014.

A partir del análisis de una planilla de datos conformada para este fin, se determinó que en el instituto se procesaron y fueron conservadas un total de 2206 muestras. Como muestra la figura 12 en resultados, la cantidad de muestras por año fue fluctuando entre 125 y 175 muestras anuales a excepción de los años 2001 y 2002 cuando disminuyó significativamente debido a que el servicio de HTLV se había suspendido en el INBIRS. En relación a los datos demográficos, no se contó con información completa para cada variable estudiada (género, edad, población, provincia de origen) en los 2206 casos ingresados, ya que el laboratorio de origen no siempre brindaba los mismos; por otro lado, el registro con la información de los pacientes a partir de la encuesta ha ido evolucionando a lo largo del tiempo en el INBIRS. De todos modos, al realizar el análisis demográfico de los 1373 individuos de los cuales se contaba con información, se determinó que el 58.6% de las muestras recibidas correspondían al género masculino y que no había diferencia estadísticamente significativa en relación al género. Tampoco existía diferencia por edad, siendo la mediana de 36 y 35 años para mujeres y hombres, respectivamente.

Con relación al país de origen, del total 9 casos correspondieron a individuos de Perú residentes en Argentina, mientras que 2 eran de Paraguay y 1 de Uruguay. Estos datos concuerdan con la característica de nuestra población, la

cual tiene un importante componente peruano; y con las características de la infección en Perú donde el HTLV-1 endémico al igual que sus patologías, ya que la mayoría de los individuos peruanos de nuestra población estaban infectados por este tipo viral. Paraguay es endémico para HTLV-2 en originarios del Gran Chaco y también se ha reportado infección por HTLV-1; éste estudio confirma la presencia de HTLV-1 en Paraguay. El individuo de Uruguay resultó negativo para la infección y no hay prácticamente datos sobre estas infecciones en este país.

En el período estudiado, prácticamente todas las provincias (n=20), a excepción de Catamarca, La Rioja y La Pampa, enviaron muestras para diagnóstico en el transcurso de los años; la mayoría provenientes de servicios de hemoterapia para confirmar el diagnóstico de donantes de sangre con un tamizaje reactivo, y si bien algunos de ellos comenzaron a realizar la confirmación y el flujo de muestras a nuestro instituto varía dependiendo del año, la cantidad de muestras se mantuvo relativamente constante (Figura 15). Esto demuestra, que si bien se implementó una ley en bancos de sangre para detectar HTLV hace más de diez años aún sigue siendo importante el rol de los laboratorios referentes para brindar un diagnóstico final.

En la Figura 12 se muestra también la variación del número de muestras que resultaron positivas para HTLV-1/2 en el período analizado, manteniéndose en el tiempo alrededor de 35 muestras anuales, excepto por los años 2001 y 2002 en el que el número de muestras analizadas fue notoriamente menor. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por nuestro grupo donde se observa que la prevalencia de la infección a lo largo del tiempo, tanto en comunidades originarias del norte del país como en donantes de sangre, se ha mantenido en los últimos 20 años debido a la carencia de planes nacionales y de información a la población [173, 174].

Más de 200 derivaciones tenían como motivo principal realizar un diagnóstico diferencial para las patologías asociadas al HTLV-1 (ATLL o HAM/TSP) lo cual indica que los médicos fueron tomando conciencia de la existencia de las patologías asociadas al HTLV-1 en nuestro país. De todos modos, vemos que la mayoría de las mismas provenían de centros de Buenos Aires, donde el grupo

HTLV de Medicina Traslacional desarrolla cursos y seminarios constantemente. Esto sugiere que aún se necesita brindar difusión y capacitación sobre el tema a profesionales de la salud.

Cuando se determinó la prevalencia final para la infección por HTLV-1/2 (28%) se observó que hubo mayor cantidad de casos HTLV-1 (441) que de HTLV-2 (154) positivos. Si consideramos que el HTLV-2 no es causante de enfermedad por lo cual no se deriva para diagnóstico diferencial y que las provincias de Chaco y Formosa endémicas para este retrovirus derivaron menos muestras que las del área endémica para HTLV-1, es lógico encontrar más casos HTLV-1 en la población estudiada.

Refiriéndonos a la eficiencia del algoritmo diagnóstico para esta infección, debemos recordar que la frecuencia de los resultados indeterminados por WB aumenta en relación a la baja especificidad de los equipos de tamizaje utilizados previamente. Un estudio que realizó el grupo HTLV del INBIRS en colaboración con distintos servicios de hemoterapia de distintas regiones sobre la comparación de ensayos de tamizaje que se utilizan actualmente en el país en donantes de sangre, concluyó que la elección de equipos de mayor especificidad impactan directamente en relación a un menor descarte de hemocomponentes que resultan mono-reactivos para esta infección [175].

En el 2014 el grupo HTLV implementó un nuevo algoritmo que consiste en confirmar molecularmente las muestras que resultan no reactivas en su laboratorio. En base a este análisis, se observó que un total de 86 muestras recibidas con tamizaje reactivo previo resultaron no reactivas y fueron confirmadas como negativas por n-PCR; además la mayoría provenían de bancos de sangre de diferentes provincias. Este dato indica que algunos laboratorios utilizan equipos de tamizaje de menor eficiencia de los existentes en el mercado, lo que resulta en mayor frecuencia de casos falsos positivos con un diagnóstico a confirmar, con todas las consecuencias que esta situación implica.

De todos modos, si consideramos que en el INBIRS se utilizan equipos de alta eficiencia, podemos observar que aún así, se obtienen resultados indeterminados western blot que requieren una confirmación molecular por n-PCR,

y algunos de ellos corresponden a casos negativos para la infección. Es por ello que las pruebas de confirmación presentan otro desafío para los bancos de sangre y servicios de transfusión. La técnica de WB es la única disponible comercialmente en las Américas, y además de ser muy costosa, a menudo da lugar a complejos patrones de reactividad, que como se explicó anteriormente deben ser interpretados como indeterminados. Esta característica actual del diagnóstico del HTLV-1/2 hace que el asesoramiento de los donantes de sangre reactivos por pruebas ELISA sea aún más complejo, lo que a menudo requiere la extracción de una segunda muestra para la repetición del ELISA y el WB [176]. Además, en los casos que siguen resultando indeterminados o HTLV positivos sin tipificar, solo quedará como única alternativa poder definir el diagnóstico mediante una técnica molecular. Nuestros datos confirman que la n-PCR tiene una mayor eficiencia que el WB, como ya ha sido demostrado en estudios previos [177].

En cuanto a los individuos positivos para la infección por HTLV-1, se determinó una mediana de edad significativamente mayor respecto a los no infectados y no se observó asociación entre la infección por HTLV-1/2 y el género en nuestra población. Estos resultados concuerdan con reportes previos que describen medianas de edad superiores en individuos infectados, antecedente lógico al ser la vía sexual uno de los principales modos de contagio [1].

Por otro lado, las enfermedades asociadas al HTLV-1 se dan generalmente en adultos, en promedio hacia los 40-50 años de edad. Mientras la ATLL es más frecuente en hombres que en mujeres (proporción hombre/mujer: 1,4), la proporción para la HAM/TSP es inversa (proporción hombre/mujer: 0,4). De los 22 casos de HAM/TSP analizados en este estudio, 13 correspondían a mujeres y de las 7 con ATLL, 4 eran mujeres.

En donantes de sangre la prevalencia de HTLV-1/2 fue de 29,1%, resultado muy superior a lo reportado tanto para áreas endémicas como no endémicas del país. Se debe considerar que ésta prevalencia se basa en un muestreo sesgado, ya que la mayoría de las muestras son derivadas por un resultado reactivo previo y además, incluyó muestras provenientes de bancos de sangre de provincias endémicas para HTLV-1/2. Refiriéndonos a las áreas no endémicas, la mayoría de

los casos eran HTLV-1, hecho que concuerda con antecedentes previos de nuestro grupo donde este tipo viral se describe como más frecuente en otras poblaciones no vulnerables [178-181]. Esta situación generalizada en nuestro país, podría deberse a que si bien comunidades de la Región Chaqueña endémicas para el HTLV-2 han migrado a las grandes ciudades, estos individuos no tienen el hábito de donar sangre. Además, contamos con migraciones de poblaciones desde países endémicos para HTLV-1 como Perú y Bolivia, que si lo hacen. Estos datos reafirman que el HTLV-1 estaría circulando con mayor frecuencia en áreas no endémicas de nuestro país. Con respecto al grupo de originarios de la Región Norte, no se observó una prevalencia significativamente mayor para HTLV-1 o HTLV-2 en comparación con la de donantes de sangre; pero este resultado es esperable nuevamente debido al sesgo de la muestra analizada

En lo que respecta a los casos HIV positivo, la prevalencia fue de 21,5%, similar a cifras descritas en estudios previos de los 90's para casos de HIV y superior a cifras reportadas en Hombres que tienen Sexo con Hombres de la ciudad de Buenos Aires (13.8%) [182]. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los casos HIV positivos coinfectados con HTLV-1/2 (9/35) de la población analizada corresponden a los años 1998 y 1999, mientras que en los años 2000 a 2014 solo se registraron 5 coinfectados de los 30 analizados. En este grupo la mayoría también resultó ser HTLV-1 positiva en oposición a estudios de años anteriores los cuales describían una mayor frecuencia de HTLV-2, tipo viral más frecuentemente relacionado a UDIs. Este dato indica que la infección por HTLV-1/2 ha disminuido en la población de individuos HIV positivos de nuestro país, evento que probablemente se deba al menor uso de drogas inyectables [183]. Considerando estos resultados, podríamos inferir que se produjo un cambio en la dinámica de la infección por HTLV-1/2 en esta población vulnerable del país, y se destaca como cambios de hábitos basados en la información y educación, pueden impactar en la prevención de una infección.

La caracterización molecular ha demostrado que dentro del subtipo a (Cosmopolita), el subgrupo A (Transcontinental) es el más distribuido

mundialmente. Por su parte, el subgrupo B (Japón) ha sido detectado en inmigrantes de Japón que viven en Perú y Brasil; además un caso fue reportado en el Argentina [184]. El análisis de las cepas provenientes de los casos con patología demostró únicamente la circulación del subgrupo A Transcontinental. Las secuencias agruparon dentro del grupo mayoritario Latinoamericano, junto a algunas cepas de Amerindios del noroeste del país. Estos datos confirman reportes previos que describen a este subgrupo circulando mayoritariamente en comunidades aborígenes de áreas endémicas del Noroeste y en individuos - incluyendo donantes de sangre- de áreas no endémicas del centro del país [85, 174, 184, 185].

Se postula que los HTLVs han surgido como consecuencia de transmisiones inter-especie ocurridas milenios atrás en el continente africano, y que la llegada de estos retrovirus al continente americano se produjo con las primeras migraciones humanas precolombinas desde el continente asiático a través del estrecho de Bering. Así, las distintas oleadas de poblaciones infectadas dieron lugar a una restricción étnica/geográfica en Sudamérica para HTLV-1 y 2. Nativos de la familia Aymará en las tierras altas pre-cordilleranas del oeste infectados por el HTLV-1 y en la región Chaqueña los Wichis y Tobas infectados por el HTLV-2. Lou y colaboradores, describieron ciertos polimorfismos de HLA-A (A\*24, A\*02) como posiblemente asociados a la susceptibilidad a infección por HTLV-1 en una población nativa de Rusia al igual que lo reportado por Sonoda y colaboradores en Japón (HLA-A\*24 y A\*26) [7, 128]. En nuestra población de individuos HTLV-1 positivos, tanto en asintomáticos como con patología, se observó una alta frecuencia del alelo A\*02 (51.9%, 41/79), no así del A\*24 (3.8%, 3/79) ni del A\*26 (ausente en nuestra población), si bien no se pudo establecer una asociación debido a la falta de resultados de individuos negativos para la infección. En Argentina se ha descrito la presencia de los alelos A\*02, A\*24 y A\*26 en individuos seronegativos con frecuencias del 48.2%, 8.9% y 5.3%, respectivamente; sin observarse diferencias significativas entre nuestra población y la descrita en la literatura para los alelos A\*02 y A\*24 [186].

En relación a las patologías asociadas al HTLV-1 sabemos que, la mayoría de los portadores del virus permanecen asintomáticos durante sus vidas y que las ATLL y HAM/TSP son más frecuentes en áreas de alta endemicidad viral. Se desconoce por qué la mayoría de los pacientes desarrollan una de las dos enfermedades en la etapa adulta y representan un pequeño porcentaje de la población infectada; el riesgo de un individuo asintomático de desarrollar alguna de estas enfermedades es de 0,25 a 3%. Es por ello, que también se realizaron estudios para asociar esta predisposición al factor genético del huésped y es así que se describieron alelos protectores y susceptibles para el desarrollo de la ATLL o de la HAM/TSP. En Jamaica, Japón y Brasil se ha descrito al alelo HLA-A\*02 como protector tanto para ATLL como para HAM/TSP, en concordancia con nuestros resultados los cuales describen a este alelo como significativamente más frecuente en individuos asintomáticos que en aquellos con patologías [7, 118, 120, 128]. En cuanto al alelo HLA-A\*33, descrito previamente como protector para ATLL en Jamaica, en nuestra población ha sido asociado significativamente con una mayor frecuencia en individuos con patologías y especialmente con HAM/TSP [128].

Hasta el momento, las terapias actuales para las patologías asociadas al HTLV-1 tienen por objeto reducir la carga proviral. Es así que en los últimos años, se ha implementado la cuantificación de la carga proviral (CPV) de HTLV-1/2 a partir de células de pacientes infectados utilizando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La determinación de la CPV es un indicador del curso de la infección en portadores asintomáticos para evaluar la propensión al desarrollo de las patologías asociadas [187]. Se ha reportado que, si bien la carga proviral sugiere una relación directa entre los niveles de CPV y severidad de enfermedad, se debe considerar que el nivel de la CPV difiere significativamente entre individuos infectados [160]. Esto se correlaciona con la dispersión de los valores observados en este trabajo. La carga proviral de HTLV-1 es notablemente alta en comparación con otras infecciones por retrovirus. Valores publicados en el tratado de neurología clínica indican que en un portador sano típico, la carga proviral media es de 0.1- 1 copia por cada 100 CMSPs, mientras que en un paciente con

mielopatía asociada al HTLV-1 (HAM/TSP) es de 5-10/100 CMSPs, pudiendo exceder las 30 copias [188]. En Brasil, por su parte, la mediana de CPV para portadores asintomáticos del virus es de 0,48 copias de HTLV-1/100 células, mientras que para pacientes con HAM/TSP, se reporta una mediana de 3,36 copias de HTLV-1/100 células [189]. Paralelamente, se han reportado en la Argentina valores mucho más bajos de CPV para estos dos grupos:  $7 \cdot 10^{-5}$  copias de HTLV-1/ 100 células para individuos sintomáticos (HAM/TSP y ATL) y  $6,12 \cdot 10^{-5}$  copias/100 para infectados asintomáticos [190]. A pesar de las variaciones en el valor de CPV, en todos los reportes publicados se concluye que existe una diferencia significativa entre el grupo de infectados asintomáticos y el grupo de individuos con patología. Recientemente, hemos observado una diferencia significativamente mayor de la CPV para un grupo de individuos con patologías en comparación con portadores asintomáticos lo cual demuestra que la misma presenta relación con la progresión de la enfermedad [159].

Es así, que algunos estudios han postulado que variantes alélicas del HLA podrían determinar los niveles de la CPV de individuos infectados por HTLV-1 [108, 125]. Sin embargo, un único estudio realizado en Japón, ha demostrado asociación entre la presencia de HLA-A\*02 con niveles de CPV bajos y protección para el desarrollo de HAM/TSP. En nuestro estudio no se obtuvo diferencia significativa entre los valores de CPV y los alelos hallados, sin embargo debemos considerar que el tamaño muestral no es suficiente para obtener datos concluyentes debido a la cantidad de polimorfismos. De todos modos, cuando los alelos se analizaron individualmente, se encontró que HLA-A\*31 se relacionó a CPV elevadas comparado a los niveles inferiores determinados para A\*02, esto último en concordancia con lo reportado anteriormente sobre el rol protector de este alelo tanto para el desarrollo de HAM/TSP como de ATL [108].

# **CONCLUSIONES**

Esta tesis de maestría amplía los conocimientos sobre la infección por HTLV-1/2 en Argentina, mediante el análisis descriptivo de todos los casos estudiados por el Grupo HTLV de Medicina Traslacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) de Buenos Aires en el periodo 1998 - 2014 y concluye que:

- El grupo HTLV del INBIRS recibió un ingreso relativamente constante de muestras por año durante el periodo estudiado, la mayoría de ellas provenientes de bancos de sangre y correspondiendo 58.6% a hombres con una mediana de edad de 35 años y 41.4% a mujeres con una mediana de edad de 36 años, sin diferencia significativa en cuanto a género ni edad.
- Aunque se utilicen equipos serológicos de alta eficiencia, el diagnóstico molecular debe ser considerado como una herramienta indispensable para brindar un resultado definitivo junto con la necesidad de contar con centros referentes para la capacitación de profesionales y asesoramiento adecuado de los individuos infectados.
- La prevalencia final de infección por HTLV-1/2 en la población estudiada fue de 28.2% con una mayor cantidad de casos HTLV-1 que de HTLV-2 positivos probablemente a que únicamente el primero es causante de enfermedad y a que las provincias de Chaco y Formosa endémicas para HTLV-2 derivaron menos muestras que las del área endémica para HTLV-1.
- En donantes de sangre de provincias no endémicas se evidencian cifras de prevalencia bajas y constantes en el tiempo mientras que en la población HIV positiva la prevalencia fue inferior a cifras descritas en estudios previos de los 90's, muy probablemente al menor uso de drogas inyectables en este grupo vulnerable.
- Se observó que ambos virus circulan en donantes de sangre de todas las regiones del país, por lo que programas de vigilancia que tengan el fin de evitar la transmisión vertical y sexual a partir de estos casos índices contribuiría significativamente a reducir la prevalencia de HTLV-1/2.

- Se identificó únicamente al subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental (Aa) del HTLV-1 en casos con patología que confirmaron nuevamente a este subtipo como mayoritario en el país, lo cual indica su transmisión años atrás a partir de originarios o por contacto con individuos o provenir de países endémicos.
- Se demostró que ambas patologías asociadas al HTLV-1, ATLL y HAM/TSP, fueron diagnosticadas esporádica pero continuamente en individuos caucásicos argentinos y peruanos, su mayoría en servicios hospitalarios de Buenos Aires y a partir del 2003.
- Se cuantificaron los niveles de carga proviral de HTLV-1 en casos de patología sin diferencias significativas entre individuos con ATLL y HAM/TSP pero superiores a la de individuos asintomáticos.
- Se identificaron los alelos HLA-A\*02, A\*31 y A\*33 tanto en individuos con ATL como en individuos con HAM/TSP, sin diferencias significativas entre los 2 grupos.
- Al comparar las frecuencias de los polimorfismos presentes en el grupo de individuos asintomáticos y con patologías, se observó que el alelo A\*02, resultó ser significativamente más frecuente en asintomáticos, mientras que el A\*33 lo era en individuos con patologías.
- Los valores de CPV obtenidos para cada alelo no presentan diferencias significativas al analizarlos en conjunto mientras que independientemente se observaron valores de CPV mayores para el alelo A\*31 en comparación con el A\*02.

Los datos descriptos contribuyen a esclarecer la importancia de incluir el evento HTLV en un Programa de Salud a nivel nacional orientado a la vigilancia, que permita brindar y difundir conocimientos sobre la situación epidemiológica de estos retrovirus y permitan implementar estrategias eficientes para la prevención, diagnóstico y asistencia médica del individuo infectado por HTLV-1/2.

## REFERENCIAS

1. Gessain, A. and O. Cassar, *Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection*. *Front Microbiol*, 2012. 3: p. 388.
2. Bangham, C.R., *HTLV-1 infections*. *J Clin Pathol*, 2000. 53(8): p. 581-6.
3. Jeffery, K.J., et al., *The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection*. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 7278-84.
4. Shimotohno, K., et al., *Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995. 82: p. 3101-05.
5. Roucoux, D.F. and E.L. Murphy, *The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II*. *AIDS Rev*, 2004. 6(3): p. 144-54.
6. Hjelle, B., et al., *Human T-cell leukemia virus type II infection frequently goes undetected in contemporary US blood donors*. *Blood*, 1993. 81(6): p. 1641-4.
7. Sonoda, S., H.C. Li, and K. Tajima, *Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal*. *Cancer Sci*, 2011. 102(2): p. 295-301.
8. Calattini, S., et al., *Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa*. *Retrovirology*, 2005. 2(1): p. 30.
9. Wolfe, N.D., et al., *Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(22): p. 7994-9.
10. Mahieux, R. and A. Gessain, *HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects*. *Viruses*, 2011. 3(7): p. 1074-90.
11. Rous, P., *A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells*. *J Exp Med*, 1911. 13(4): p. 397-411.
12. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. *Nature*, 1970. 226(5252): p. 1209-11.
13. Gallo, R.C., *Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. 24(4): p. 559-65.
14. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. *Science*, 1976. 193(4257): p. 1007-8.

15. Uchiyama, T., et al., *Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases*. *Blood*, 1977. 50(3): p. 481-92.
16. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma, *Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(6): p. 2031-5.
17. Poiesz, B.J., et al., *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 U S A*, 1980. 77(12): p. 7415-9.
18. Hinuma, Y., et al., *Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(10): p. 6476-80.
19. Kalyanaraman, V.S., et al., *A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia*. *Science*, 1982. 218(4572): p. 571-3.
20. Rosenblatt, J.D., et al., *A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia*. *N Engl J Med*, 1986. 315(6): p. 372-7.
21. International Committee on Taxonomy of Viruses, R.I.B.F., *Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [for the] Virology Division of the International Union of Microbiological Societies* 1991: Springer-Verlag.
22. Soriano, V. and A. Trevino, *[New human retrovirus]*. *Med Clin (Barc)*, 2010. 135(2): p. 65-6.
23. Van Dooren, S., M. Salemi, and A.M. Vandamme, *Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes*. *Mol Biol Evol*, 2001. 18(4): p. 661-71.
24. LeBreton, M., et al., *A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4*. *Emerg Microbes Infect*, 2014. 3(1): p. e7.
25. Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology*. Third edition edited by B.N. Fields DM, Knipe PM, Howley, et al. Raven Publishers, Philadelphia, 1996. Chapter 51: 1437-500.
26. Fields, B.N., *Fields' Virology* 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
27. Barbeau, B., J.M. Peloponese, and J.M. Mesnard, *Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis*. *Front Microbiol*, 2013. 4: p. 226.

28. Switzer, W.M., et al., *Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4*. *Retrovirology*, 2009. 6: p. 9.
29. Rho, H.M., et al., *Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line*. *Virology*, 1981. 112(1): p. 355-60.
30. Hollsberg, P., *Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. 63(2): p. 308-33.
31. Vallejo, A. and V. Soriano, *[Human lymphotropic virus type I (HTLV-I)]*. *Med Clin (Barc)*, 1995. 104(11): p. 426-35.
32. Ahmadi Ghezeldasht, S., et al., *Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Oncogenesis: Molecular Aspects of Virus and Host Interactions in Pathogenesis of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATL)*. *Iran J Basic Med Sci*, 2013. 16(3): p. 179-95.
33. Zaninovic, V., J. Galindo, and A. Blank, *Enfermedades asociadas con el virus HTLV-I*. Fundación Mar, Cali, Colombia, 1992.
34. Matsuoka, M. and J. Yasunaga, *Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor*. *Curr Opin Virol*, 2013. 3(6): p. 684-91.
35. Currer, R., et al., *HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways*. *Front Microbiol*, 2012. 3: p. 406.
36. Felber, B.K., et al., *The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats*. *Science*, 1985. 229(4714): p. 675-9.
37. Buckle, G.J., D.A. Hafler, and P. Hollsberg, *HTLV-I-induced T-cell activation*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996. 13 Suppl 1: p. S107-13.
38. Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, and M. Aboud, *Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity*. *Retrovirology*, 2004. 1: p. 20.
39. Lairmore, M.D., R. Haines, and R. Anupam, *Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease*. *Curr Opin Virol*, 2012. 2(4): p. 474-81.
40. Sun, S.C. and S. Yamaoka, *Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation*. *Oncogene*, 2005. 24(39): p. 5952-64.
41. Jeang, K.T., et al., *Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation*. *J Biol Chem*, 2004. 279(31): p. 31991-4.

42. Yasunaga, J. and M. Matsuoka, *Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms*. *Cancer Control*, 2007. 14(2): p. 133-40.
43. Hagiya, K., et al., *ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells*. *Retrovirology*, 2011. 8: p. 19.
44. Matsuoka, M. and K.T. Jeang, *Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report*. *Cancer Res*, 2005. 65(11): p. 4467-70.
45. Grone, M., C. Koch, and R. Grassmann, *The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation*. *Virology*, 1996. 218(2): p. 316-25.
46. Edwards, D., et al., *Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence*. *Viruses*, 2011. 3(6): p. 861-85.
47. Feuer, G. and P.L. Green, *Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2*. *Oncogene*, 2005. 24(39): p. 5996-6004.
48. Matsuoka, M., *Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL)*. *Retrovirology*, 2005. 2: p. 27.
49. Yasunaga, J. and M. Matsuoka, *Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis*. *Int J Hematol*, 2011. 94(5): p. 435-42.
50. Lambert, S., et al., *HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165*. *Blood*, 2009. 113(21): p. 5176-85.
51. Ehrlich, G.D. and B.J. Poiesz, *Clinical and molecular parameters of HTLV-I infection*. *Clin Lab Med*, 1988. 8(1): p. 65-84.
52. Mazurov, D., et al., *Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors*. *PLoS Pathog*, 2010. 6(2): p. e1000788.
53. Pais-Correia, A.M., et al., *Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses*. *Nat Med*. 16(1): p. 83-9.
54. Asquith, B. and C.R. Bangham, *How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response?* *Trends Immunol*, 2008. 29(1): p. 4-11.
55. Igakura, T., et al., *Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton*. *Science*, 2003. 299(5613): p. 1713-6.
56. Takatsuki, K., *Discovery of adult T-cell leukemia*. *Retrovirology*, 2005. 2: p. 16.

57. Wiktor, S.Z., et al., *Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding*. J Hum Virol, 1997. 1(1): p. 37-44.
58. Hino, S., et al., *Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I*. Jpn J Cancer Res, 1985. 76(6): p. 474-80.
59. Kaplan, J.E., et al., *The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1990. 3(11): p. 1096-101.
60. Pombo-de-Oliveira, M.S., et al., *Adult T-cell leukemia/lymphoma and cluster of HTLV-I associated diseases in Brazilian settings*. Leuk Lymphoma, 2001. 42(1-2): p. 135-44.
61. Fujino, T. and Y. Nagata, *HTLV-I transmission from mother to child*. J Reprod Immunol, 2000. 47(2): p. 197-206.
62. Take, H., et al., *Transmission routes of HTLV-I: an analysis of 66 families*. Jpn J Cancer Res, 1993. 84(12): p. 1265-7.
63. Chen, Y.M., et al., *Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with the presence of anti-Tax antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(4): p. 1182-6.
64. Stuver, S.O., et al., *Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study*. J Infect Dis, 1993. 167(1): p. 57-65.
65. Moriuchi, M. and H. Moriuchi, *Seminal fluid enhances replication of human T-cell leukemia virus type 1: implications for sexual transmission*. J Virol, 2004. 78(22): p. 12709-11.
66. Osame, M., *Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP*. In: Blattner W (ed) Human retrovirology: HTLV. Raven, New York, 1990: p. 191-197.
67. Nakatsuji, Y., et al., *HTLV-I-associated myelopathy manifested after renal transplantation*. J Neurol Sci, 2000. 177(2): p. 154-6.
68. Soyama, A., et al., *Human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy following living-donor liver transplantation*. Liver Transpl, 2008. 14(5): p. 647-50.
69. Slattery, J.P., G. Franchini, and A. Gessain, *Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses*. Genome Res, 1999. 9(6): p. 525-40.

70. Proietti, F.A., et al., *Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases*. *Oncogene*, 2005. 24(39): p. 6058-68.
71. Garcia-Vallejo, F., *El nómada molecular: la historia molecular del virus linfotrópico humano (HTLV-1)*. 2004: Universidad del Valle.
72. Froment, A., et al., *HTLV-II among pygmies from Cameroon*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993. 9(8): p. 707.
73. Goubau, P., et al., *Detection of HTLV-I and HTLV-II infection in Africans using type-specific envelope peptides*. *J Med Virol*, 1993. 39(1): p. 28-32.
74. Cabral, M.B., et al., *HTLV-I/II antibodies among three different Indian groups from Paraguay*. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995. 10: p. 199.
75. Cartier, L., et al., *Southernmost carriers of HTLV-I/II in the world*. *Jpn J Cancer Res*, 1993. 84(1): p. 1-3.
76. Echeverria de Perez, G., et al., *First description of endemic HTLV-II infection among Venezuelan Amerindians*. *J of Acquir Immune Defic Syndr*, 1993. 6: p. 1368-1372.
77. Fujiyama, C., et al., *A new endemic focus of human T lymphotropic virus type II carriers among Orinoco natives in Colombia*. *J Infect Dis*, 1993. 168(4): p. 1075-7.
78. Moreira, E.D., Jr., et al., *Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993. 6(8): p. 959-63.
79. Manns, A., M. Hisada, and L. La Grenade, *Human T-lymphotropic virus type I infection*. *Lancet*, 1999. 353(9168): p. 1951-8.
80. Taylor, G., *The epidemiology and clinical impact of HTLV infections in Europe*. *AIDS Rev*, 1999. 1: p. 195-204.
81. Lombardi, V., et al., *Overt and latent HIV 1 and HTLV-I infection in cohorts of at high risk individuals in Argentina*. *Mol Cell Probes*, 1991. 5(6): p. 409-17.
82. Murphy, E.L., et al., *Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type aO*. *Virology*, 1998. 242(2): p. 425-34.
83. Zella, D., et al., *HTLV-II infection in Italian drug abusers*. *Lancet*, 1990. 336(8714): p. 575-6.

84. Van Dooren, S., et al., *Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus type I in Latin America*. J Gen Virol 1998. 79: p. 2695-2708.
85. Kashima, S., et al., *Distribution of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. 22(10): p. 953-9.
86. Barreto, F.K., et al., *Molecular characterization of the human T cell lymphotropic virus type 2 long terminal repeat region: A discussion about possible influences at viral gene expression*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2014. 30(1): p. 92-6.
87. Hall, W.W., et al., *Concomitant infections with human T-cell leukemia viruses (HTLVs) and human immunodeficiency virus (HIV) identification of HTLV. Infection in intravenous drug abusers (IVDAs)*. In Human Retrovirology: HTLV. WA Blattner (Ed). New York: Raven Press, 1990: p. 125-7.
88. Lewis, M.J., et al., *Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II)*. Virology, 2000. 271(1): p. 142-54.
89. Goubau, P., *HTLV-II in Africa*. VIII International Conference on Human Retrovirology: HTLV. Río de Janeiro, Brasil, June 9-13, 1997.
90. Verdonck, K., et al., *Human T-lymphotropic virus I: recent knowledge about an ancient infection*. Lancet Infect Dis, 2007. 7(4): p. 266-81.
91. Barmak, K., et al., *Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration*. Virology, 2003. 308(1): p. 1-12.
92. Osame, M., et al., *HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity*. Lancet, 1986. 1(8488): p. 1031-2.
93. Cook, L.B., et al., *HTLV-I: persistence and pathogenesis*. Virology, 2013. 435(1): p. 131-40.
94. Croda, M.G., et al., *Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort*. J Neurol Sci, 2008. 269(1-2): p. 133-7.
95. Harrington, W.J., Jr., et al., *Tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM): treatment with an anabolic steroid danazol*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1991. 7(12): p. 1031-4.
96. Rafatpanah, H., et al., *The impact of interferon-alpha treatment on clinical and immunovirological aspects of HTLV-I-associated myelopathy in northeast of Iran*. J Neuroimmunol, 2012. 250(1-2): p. 87-93.

97. Cordoliani, F., et al., [*Adult T-cell lymphoma associated with HTLV-I: a familial form*]. *Ann Dermatol Venereol*, 1998. 125(10): p. 708-10.
98. Mahieux, R. and A. Gessain, *HTLV-I and associated adult T-cell leukemia/lymphoma*. *Rev Clin Exp Hematol*, 2003. 7(4): p. 336-61.
99. Dasanu, C.A., *Newer developments in adult T-cell leukemia/lymphoma therapeutics*. *Expert Opin Pharmacother*. 12(11): p. 1709-17.
100. Nasr, R., et al., *Controversies in targeted therapy of adult T cell leukemia/lymphoma: ON target or OFF target effects?* *Viruses*. 3(6): p. 750-69.
101. Carpentier, A., et al., *Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type I Transmission, Replication and Persistence*. *Viruses*, 2015. 7(7): p. 3603-24.
102. Blattner, W.A., *Human T-lymphotropic viruses and diseases of long latency*. *Ann Intern Med*, 1989. 111(1): p. 4-6.
103. Bangham, C.R. and M. Osame, *Cellular immune response to HTLV-I*. *Oncogene*, 2005. 24(39): p. 6035-46.
104. Jeffery, K.J., et al., *HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(7): p. 3848-53.
105. Kawamata, T., et al., *A case of post-transplant adult T-cell leukemia/lymphoma presenting myelopathy similar to but distinct from human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy*. Springerplus, 2014. 3: p. 581.
106. Iwasaki, Y., *Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy*. *Brain Pathol.*, 1993. 3(1): p. 1-10.
107. B.O. 31/01/05 *Salud Pública. Resolución 58/2005. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. Normas técnicas y administrativas de la especialidad de hemoterapia. Accesible en [www.femeba.org.ar/fundacion](http://www.femeba.org.ar/fundacion). Último acceso 05-22-2010.*
108. Trevino, A., et al., *Association between HLA alleles and HAM/TSP in individuals infected with HTLV-I*. *J Neurol*, 2013. 260(10): p. 2551-5.
109. Osame, M., et al., *Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion*. *Ann Neurol*, 1990. 28(1): p. 50-6.
110. Tajima, K., *The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group*. *Int J Cancer*, 1990. 45(2): p. 237-43.

111. Blank, A., et al., *Six Colombian patients with adult T-cell leukemia/lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 1993. 9(4-5): p. 407-12.
112. Zamora, T., et al., *Antibody to HTLV-I in indigenous inhabitants of the Andes and Amazon regions in Colombia*. *Jpn J Cancer Res*, 1990. 81(8): p. 715-9.
113. Carvalho, E.M., et al., *Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type I-infected blood donors*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2001. 27(1): p. 1-6.
114. White, J.D., et al., *Distribution of human leukocyte antigens in a population of black patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996. 5(11): p. 873-7.
115. Sonoda, S., T. Fujiyoshi, and S. Yashiki, *Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996. 13 Suppl 1: p. S119-23.
116. Manns, A., et al., *Human leukocyte antigen class II alleles associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection and adult T-cell leukemia/lymphoma in a Black population*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(8): p. 617-22.
117. Yashiki, S., et al., *HLA-A\*26, HLA-B\*4002, HLA-B\*4006, and HLA-B\*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type I tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type I tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(11): p. 1047-61.
118. Borducchi, D.M., et al., *Human leucocyte antigen and human T-cell lymphotropic virus type I associated diseases in Brazil*. *Br J Haematol*, 2003. 123(5): p. 954-5.
119. Sabouri, A.H., et al., *Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals*. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 3): p. 773-81.
120. Coelho-dos-Reis, J.G., et al., *[Evaluation of the performance of immunological parameters as indicators for clinical progression of chronic HTLV-1 infection]*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2007. 40(1): p. 29-36.
121. Rafatpanah, H., et al., *Association between HLA-DRB1\*01 and HLA-Cw\*08 and outcome following HTLV-I infection*. *Iran J Immunol*, 2007. 4(2): p. 94-100.
122. Goedert, J.J., et al., *Risk of human T-lymphotropic virus type I-associated diseases in Jamaica with common HLA types*. *Int J Cancer*, 2007. 121(5): p. 1092-7.

123. Macnamara, A., et al., *HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-I infection*. PLoS Pathog, 2010. 6(9): p. e1001117.
124. Talledo, M., et al., *Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-I-infected patients*. J Med Virol, 2010. 82(3): p. 460-6.
125. Taghaddosi, M., et al., *Association between HLA Class I Alleles and Proviral Load in HTLV-I Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraperesis (HAM/TSP) Patients in Iranian Population*. Iran J Basic Med Sci, 2013. 16(3): p. 264-7.
126. Bartholomew, C., et al., *HTLV-I serostatus of mothers of patients with adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*. J Hum Virol, 1998. 1(4): p. 302-5.
127. Kayembe, K., et al., *A cluster of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Equateur (Zaire): ethnic and familial distribution*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990. 53(1): p. 4-10.
128. Lou, H., et al., *HLA class I and class II of the Nivkhi, an indigenous population carrying HTLV-I in Sakhalin, Far Eastern Russia*. Tissue Antigens, 1998. 52(5): p. 444-51.
129. Seich Al Basatena, N.K., et al., *KIR2DL2 enhances protective and detrimental HLA class I-mediated immunity in chronic viral infection*. PLoS Pathog, 2011. 7(10): p. e1002270.
130. Egea, E.G., G.; Ángel, L.; Callejas, D.; Blank, A.; Iglesias, A.; Caraballo, L.; Jiménez, S. , *Restricción étnica y geográfica de la infección causada por el virus HTLV-II y su asociación con el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad en tres subpoblaciones del Caribe colombiano* Acta Médica Colombiana, 1999 24(4): p. 137-143.
131. Deschamps, R., et al., *Absence of consistent association between human leukocyte antigen-I and -II alleles and human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis risk in an HTLV-I French Afro-Caribbean population*. Int J Infect Dis, 2010. 14(11): p. e986-90.
132. Fujiyoshi, T., et al., *Ethnic segregation of HTLV-I and HTLV-II carriers among South American native Indians*. Int J Cancer, 1995. 63(4): p. 510-5.
133. Libonatti, O., et al., *[Prevalence of anti-HTLV-I antibodies in intravenous drug addicts in Argentina]*. Medicina (B Aires), 1989. 49(5): p. 546-7.
134. Pampuro, S.E., et al., *Presence of human T-cell lymphotropic virus types I and II and coinfection with human immunodeficiency virus in different groups at risk in Argentina*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. 6(7): p. 851-2.

135. Biglione, M., et al., *Endemic HTLV-II infection among Tobas and Matacos Amerindians from north Argentina*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. 6(6): p. 631-3.
136. Ferrer, J.F., et al., *Endemic infection with human T cell leukemia/lymphoma virus type IIB in Argentinean and Paraguayan Indians: epidemiology and molecular characterization*. J Infect Dis, 1996. 174(5): p. 944-53.
137. De Vito, C., et al., *HTLV-I/II survey on hemodialysis patients in Buenos Aires*. J of Acquir Immune Defic Syndr and Hum Retrovirol, 1996. 12: p. 525-6.
138. Gutfraind, Z., et al., *Evaluation of HTLV-I/II infection in blood donors in Buenos Aires*. Medicina (B Aires), 1995. 55(4): p. 295-9.
139. Bouzas, M.B., et al., *HTLV type I and HTLV type II infection among Indians and natives from Argentina*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. 10(11): p. 1567-71.
140. Zala, C., et al., *Human T-cell lymphotropic virus type I disease in Argentine intravenous drug users with human immunodeficiency virus type I infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1994. 7(8): p. 870-1.
141. Gioseffi, O.N., et al., *[Adult HTLV-I positive leukemia-lymphoma in Argentina]*. Sangre (Barc), 1995. 40(5): p. 421-4.
142. Prates, V., et al., *The first report of familial adult T-cell leukemia/lymphoma in Argentina*. Leuk Lymphoma, 2000. 37(1-2): p. 225-7.
143. Gonzalez, L.A., et al., *Further studies on HTLV-I associated myelopathy in Argentina*. Medicina (B Aires), 1998. 58(4): p. 411-4.
144. Biglione, M., et al., *High prevalence of HTLV-I infection in Argentinian blood donors: a new HTLV-I-endemic area?* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1999. 20(1): p. 101-2.
145. Dipierri, J.E., et al., *A seroepidemiological survey of HTLV-I/II carriers in the Puna Jujena*. Medicina (B Aires), 1999. 59(6): p. 717-20.
146. Herrera MP, C.J., Lovaglio R, Aguirre R., *Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV). Seroprevalencia en bancos de sangre de la provincia de Salta*. Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes, 2012: p. 10-14.
147. Remondegui, C., *Paraparesia espástica tropical por HTLV-I en la provincia de Jujuy*. Boletín sobre el SIDA en la Argentina, 1998. 14: p. 20-28.
148. Biglione, M.M., et al., *A cluster of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Jujuy, Argentina*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. 32(4): p. 441-5.

149. Marin, O., et al., *Adult T-cell leukemia/lymphoma in Jujuy, north-west Argentina*. *Pathol Int*, 2002. 52(5-6): p. 348-57.
150. Biglione, M., et al., *Seroepidemiological and molecular studies of human T cell lymphotropic virus type II, subtype b, in isolated groups of Mataco and Toba Indians of northern Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. 15(5): p. 407-17.
151. Rodriguez C, B.M., Muracciole D. et al., *Seroprevalencia de HTLV-1/2 en la ciudad de Formosa*. Presented at the Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina, August 29-31., 2001.
152. Berini, C.A., et al., *HTLV-1/2 among high-risk groups in Argentina: molecular diagnosis and prevalence of different sexual transmitted infections*. *J Med Virol*, 2007. 79(12): p. 1914-20.
153. Biglione, M.M., L. Astarloa, and H.E. Salomon, *High prevalence of HTLV-I and HTLV-II among blood donors in Argentina: a South American health concern*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005. 21(1): p. 1-4.
154. Berini, C.A., et al., *Predominance of Human Lymphotropic T Cell Virus Type 2 Subtype b in Urban Populations of Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
155. Pataccini, G., et al., *Circulación del Virus HTLV-1 subtipo cosmopolita (a)/subgrupo transcontinental (A) en donantes de sangre de áreas no endémicas de Argentina*. XV Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. Chascomús, Argentina, 2013.
156. Waziri, A., et al., *Characterization and sequencing of prototypic human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 seroindeterminate patient*. *J Virol*, 2000. 74(5): p. 2178-85.
157. Demontis, M.A., S. Hilburn, and G.P. Taylor, *Human T cell lymphotropic virus type 1 viral load variability and long-term trends in asymptomatic carriers and in patients with human T cell lymphotropic virus type 1-related diseases*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013. 29(2): p. 359-64.
158. Waters, A., et al., *Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results*. *J Clin Virol*, 2011. 52(1): p. 38-44.
159. Canepa, C., et al., *Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related?* *Viruses*, 2015. 7(11): p. 5643-58.
160. Montanheiro, P.A., et al., *Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-*

- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*. Braz J Med Biol Res, 2005. 38(11): p. 1643-7.
161. Vitone, F., et al., *Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) prevalence and quantitative detection of DNA proviral load in individuals with indeterminate/positive serological results*. BMC Infect Dis, 2006. 6: p. 41.
  162. *Leads from the MMWR. Update: serologic testing for antibody to human immunodeficiency virus*. Jama, 1988. 259(5): p. 653, 656, 662-4.
  163. *The HTLV European Research Network. Seroepidemiology of the human T-cell leukaemia/lymphoma viruses in Europe*. . J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. 13(1): p. 68-77.
  164. Tuke, P.W., P. Luton, and J.A. Garson, *Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of 'nested' PCR products*. J Virol Methods, 1992. 40(2): p. 163-73.
  165. Heneine, W., et al., *Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II-seropositive individuals*. J Clin Microbiol, 1992. 30(6): p. 1605-7.
  166. Albrecht, B., et al., *Quantification of human T-cell lymphotropic virus type I proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 1998. 75(2): p. 123-40.
  167. Furtado, L.V., et al., *Characterization of large genomic deletions in the FBNI gene using multiplex ligation-dependent probe amplification*. BMC Med Genet, 2011. 12: p. 119.
  168. Meertens, L., et al., *Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type I from Africa: close relationship of STLV-1 from Allenopithecus nigroviridis to HTLV-1 subtype B strains*. Virology, 2001. 287(2): p. 275-85.
  169. Cereb, N., et al., *Locus-specific amplification of HLA class I genes from genomic DNA: locus-specific sequences in the first and third introns of HLA-A, -B, and -C alleles*. Tissue Antigens, 1995. 45(1): p. 1-11.
  170. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. 22(22): p. 4673-80.
  171. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. 24(8): p. 1596-9.

172. Eirin, M.E., et al., *Divergent strains of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) within the Cosmopolitan subtype in Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008. 24(10): p. 1237-44.
173. Berini, C.A., et al., *Decreasing trends in HTLV-1/2 but stable HIV-1 infection among replacement donors in Argentina*. *J Med Virol*, 2010. 82(5): p. 873-7.
174. Eirin, M.E., et al., *Stable human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) subtype a/subgroup a endemicity in Amerindians from Northwest Argentina: a health problem to be resolved*. *J Med Virol*. 82(12): p. 2116-22.
175. Pataccini, G.C., C.; Salido, J.; Delfino, C.; Blejer, J.; Fernández, R.; Rodriguez, E.; Alter, A.; Pedrozo, W.; Malan, R.; Iriarte, E.; Duarte, G.; Schneider, V.; Bontti, S.; Salomon, C.; Borda, M.; Biglione, M.; Berini, CA. , *Comparison of human T cell leukemia virus-1/2 (HTLV-1/2) screening assays in South America: Implications in the loss of blood units. , in 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses*.2014, Retrovirology: Montreal, Canada. p. 216.
176. Carneiro-Proietti, A.B., et al., *HTLV in the Americas: challenges and perspectives*. *Rev Panam Salud Publica*, 2006. 19(1): p. 44-53.
177. Berini, C.A., et al., *Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina*. *J Med Virol*, 2007. 79(1): p. 69-73.
178. Gastaldello, R., W.W. Hall, and S. Gallego, *Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004. 35(3): p. 301-8.
179. Berini, C.A., et al., *HTLV-1 cosmopolitan and HTLV-2 subtype b among pregnant women of non-endemic areas of Argentina*. *Sex Transm Infect*.
180. Eirin ME, B.C., Jones L, Berini C, Delfino C, Biglione MM., *Ethnic/geographic analysis of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) infection among Buenos Aires residents in Argentina*. *Retrovirology*, 2011. 8((Suppl 1)): p. A88.
181. Malan, R., et al., *[Seroprevalence of HTLV-1/2 in blood donors from Misiones Province]*. *Medicina (B Aires)*, 2010. 70(1): p. 71-4.
182. Pando, M.A., et al., *Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus, Viral Hepatitis (B and C), Treponema pallidum, and Human T-Cell Lymphotropic I/II Virus Among Men Who Have Sex With Men in Buenos Aires, Argentina*. *Sex Transm Dis*, 2006. Publish Ahead of Print.
183. Rossi, D., et al., *The HIV/AIDS epidemic and changes in injecting drug use in Buenos Aires, Argentina*. *Cad Saude Publica*, 2006. 22(4): p. 741-50.

184. Gastaldello, R., et al., *HTLV type I genetic types among native descendants in Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008. 24(9): p. 1139-46.
185. Fujiiyoshi, T., et al., *Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. 15(14): p. 1235-9.
186. de Sorrentino, A.H., et al., *HLA class I alleles associated with susceptibility or resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection among a population in Chaco Province, Argentina*. *J Infect Dis*, 2000. 182(5): p. 1523-6.
187. Tamegao-Lopes, B.P., et al., *[HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR]*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2006. 39(6): p. 548-52.
188. Nogales-Gaete, J.D., A.; Verdugo, R.,; *Tratado de Neurología Clínica*. Ediciones Universitaria, ed. P.y.N. Sociedad de Neurología, Chile 2005
189. Furtado Mdos, S., et al., *Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease*. *J Med Virol*, 2012. 84(4): p. 664-71.
190. Altamirano, N.A., et al., *Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation*. *J Virol Methods*, 2010. 170(1-2): p. 160-4.

**M. Remesar, A. Mangano, L. Sen & A. del Pozo. Profile of human T-cell lymphocytotropic virus-I/II infections in an Argentinean blood bank population. *Vox Sanguinis* (2002) 83, 364–365.**