

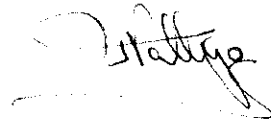
# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Biología Celular

## **Detección de los retrovirus linfotrópicos de células T humanos de tipo I (HTLV-I) y tipo II (HTLV-II). Aislamiento y caracterización de los primeros HTLV-II españoles.**

*Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas por:*

**Alejandro Vallejo Tiller**



Director de la Tesis:

**Dr. Alfredo García Sáiz**

Jefe de Servicio de Diagnóstico y Referencia  
Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus  
(CNBCR). Instituto de Salud Carlos III

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Biología Celular**



**Detección de los retrovirus linfotrópicos de células T  
humanos de tipo I (HTLV-I) y tipo II (HTLV-II).  
Aislamiento y caracterización de los primeros  
HTLV-II españoles.**

**Alejandro Vallejo Tiller**

**1993**

**Alfredo García Sáiz, Dr. en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio de Diagnóstico y Referencia del Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus (CNBCR), Instituto de Salud Carlos III,**

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada *Detección de retrovirus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) de tipo I y tipo II. Aislamiento y secuenciación de los primeros HTLV-II españoles*, realizada por Alejandro Vallejo Tiller para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura.

Y para que así conste, firmo la presente en Majadahonda a 6 de Junio de 1993.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alfredo García Sáiz', written in a cursive style.

**Dr. Alfredo García Sáiz**

Quiero agradecer el gran apoyo y la buena dirección que he recibido del Dr. Alfredo García Sáiz, con los cuales he podido llevar a término este trabajo.

Quiero demostrar también mi agradecimiento a la Dra. Ascensión Bernal, que junto a Angeles Pablos me ayudaron a dar los primeros pasos.

A Concepción Casado, José María Varela, Dr. Gerardo Contreras y a todo el personal del Servicio de Diagnóstico y Referencia, por su ayuda técnica.

Al Dr. Cecilio López Galíndez por sus críticas y consejos en importantes aspectos de este trabajo, así como a los Drs. Isabel Olivares y José María Rojas.

A la Dra. Inmaculada Herrera y el Servicio de Microscopía del CNBCR, por la colaboración que me han prestado. A Angel del Pozo por su excelente trabajo de fotografía.

A Agustín Benito y al Dr. Jorge Alvar por su importante ayuda en la realización de varios aspectos del trabajo.

A Alicia Téllez, que por su culpa me metí en este lío.

A Isa (cuya amistad y paciencia me hicieron más fácil la realización de esta tarea), Carmen (cuyos microcortes han realizado este trabajo), Marta, Ester, Javier (con quien mantenía amenas discusiones), Elo, Alicia, Blanca, Inés, quienes me han ayudado mucho en mi trabajo y fuera de él... Y quisiera recordar a Trini porque nunca me ganó al tenis.

Y por último, quiero agradecer al Dr. Rafael Nájera el gran apoyo e interés por mi trabajo.

Mi agradecimiento al Instituto de Salud Carlos III que ha permitido la realización de este trabajo gracias a la concesión de una beca predoctoral.

Estaba preparando los reactivos necesarios para hacer una amplificación de un ADN de un virus llamado linfotrópico, o algo parecido, cuando sentí que no estaba sólo. Alguien o algo estaba mirándome cuidadosamente, intentando entrar en lo más profundo de mi mente.

Me estremecí porque antes nadie lo había intentado y mucho menos yo lo había permitido. Intenté no darle importancia y disimular. Sin embargo, esa sensación persistía y me animó a desenmascarar al intruso. Fijándome en todo lo que me rodeaba noté cómo el ADN que preparaba estaba al acecho, dispuesto a introducirse en mi mente. No había tiempo para pensar, así que me quedé quieto esperando acontecimientos. Eran las doce de la noche y nadie podía ayudarme.

Mientras pensaba cómo evitar semejante intromisión en mi mente, noté cómo ese ADN ya estaba dentro de mí, intentando llegar hasta lo más profundo. La angustia me impedía reaccionar, con lo que el intruso tenía vía libre. Rápidamente cerré el libro que contenía el ADN y lo puse a amplificar, pensando que así me dejaría en paz. Pero el intruso se había quedado dentro de mí, recorriendo a sus anchas toda mi mente, pudiendo develar todos mis secretos.

No me enteré hasta donde llegó y qué fue lo que descubrió porque yo, por mi parte, me había quedado dentro del libro y me estaba amplificando cada dos minutos.

*A Rosi , Fernando*

*y Jania*

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1. BIOLOGIA MOLECULAR</b> .....	6
1.1 Estructura genética .....	6
1.2 Productos génicos .....	8
1.3 Regulación de la expresión génica .....	12
1.4 Mecanismos de transformación .....	14
<b>2. BIOLOGIA</b> .....	18
2.1 Actividad biológica in vivo e in vitro .....	18
2.2 Receptores celulares .....	18
2.3 Patologías asociadas .....	19
<b>3. EPIDEMIOLOGIA.</b> .....	21
3.1 Diagnóstico de la infección .....	21
Detección de anticuerpos .....	21
Detección de antígeno .....	23
Detección de ácidos nucleicos .....	23
Aislamiento .....	24
3.2 Modos de transmisión .....	24
3.3 Distribución geográfica .....	26
<b>4. HETEROGENEIDAD GENETICA</b> .....	30
<b>5. TERAPIA ANTIVIRICA</b> .....	34
<b>2. Objetivos</b> .....	39
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	41
1. CASOS ESTUDIADOS .....	42
2. LINEAS CELULARES .....	44



3. ESTUDIO SEROLOGICO .....	44
3.1 Ensayo inmunoenzimático (ELISA) .....	44
3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	45
3.3 Western blot (WB) .....	46
4. CULTIVOS CELULARES .....	47
4.1 Subcultivos celulares .....	47
4.2 Purificación de linfocitos.. ..	48
4.3 Crecimiento de virus .....	48
5. DETECCION DEL VIRUS .....	49
5.1 Inmunofluorescencia (IFI) .....	49
5.2 Amplificación del material genético (PCR) .....	49
Extracción del ADN .....	49
Reacción de amplificación .....	50
Southern blot, marcaje de sondas e hibridación .....	52
5.3 Detección de antígeno p24 soluble en sobrenadante de cultivos .....	52
5.4 Secuenciación .....	53
6. SENSIBILIDAD A ANTIVIRICOS .....	54
<b>4. Resultados I. Detección simultánea de los retrovirus HTLV</b> <i>de tipo I y tipo II por PCR-simple y diferenciación por PCR-anidada .....</i>	<b>55</b>
<b>5. discusión I .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Resultados II. Diagnóstico de infección por HTLV-I/II .....</b>	<b>70</b>
<b>7. discusión II .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Resultados III. Caracterización fenotípica, secuenciación</b> <i>y sensibilidad a zidovudina de los aislados de HTLV-II .....</i>	<b>107</b>
<b>9. discusión III .....</b>	<b>122</b>
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>130</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>133</b>



---

## Abreviaturas

aa	: Aminoácido
ADN	: Acido desoxirribonucleico
CBL	: Linfocitos de sangre de cordón umbilical
Ci	: Curio
dATP	: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dTTP	: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dCTP	: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DMSO	: Dimetil sulfóxido
D.O.	: Densidad óptica
ECT	: Efecto citopático
ELISA	: Eusayo inmunoenzimático
HTLV-I	: Virus linfotrópico de células T humano de tipo I
HTLV-II	: Virus linfotrópico de células T humano de tipo II
IFI	: Inmunofluorescencia indirecta
IL-2	: Interleucina 2
MF	: <i>Mycosis fungoide</i>
min.	: Minuto
nt	: Nucleótido
<sup>32</sup> P	: Isótopo fosforo 32
pb	: Pares de bases
PBL	: Linfocitos de sangre periférica
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RIPA	: Radioinmunoprecipitación
TA	: Temperatura ambiente
u	: Unidades
WB	: Western blot

# INTRODUCCION

---

**L**os primeros retrovirus se aislaron de leucemias y sarcomas de pollos en los primeros años del siglo XX cuando en 1908 Ellermann y Bang (Ellermann y Bang, 1908) lograron transmitir al pollo una forma de leucemia mieloblástica a partir de filtrados y Rous, en 1911, demostró la transmisibilidad del sarcoma aviar también a partir de filtrados (Rous, 1911). El siguiente gran descubrimiento, alrededor de 1950, fue el virus de la leucemia murina (MLV) que podía inducir leucemia en ratones recién nacidos (Gross, 1951). Posteriormente, mediados de los años 60, se encontró que el causante de las neoplasias hematopoyéticas en gatos era otro retrovirus, el virus de la leucemia felina (FLV). Este virus causa leucemia después de un largo período de latencia y en un pequeño porcentaje de animales infectados (Jarret y cols., 1964).

Sólo cuando se logró cultivar células tumorales se pudo seguir identificando más tipos de virus. Así fue como se identificó al virus de la leucemia bovina (BLV). En 1970 se identificó por primera vez una proteína que transcribía a ADN el ARN vírico a la que se llamó transcriptasa inversa (Baltimore y cols., 1970). Esta proteína está presente en todos los retrovirus y puede ser detectada fácilmente por su actividad enzimática. A partir de este momento se realizaron muchos estudios con el fin de detectar retrovirus humanos, pero existían una serie de inconvenientes. En el caso de los retrovirus hasta ese momento descritos, la replicación vírica y la viremia eran muy abundantes, situación nada parecida en el caso de los retrovirus humanos descritos hasta la fecha. Por otra parte, algunos retrovirus pueden permanecer en estado latente por un largo período de tiempo (como el caso del BLV).

Por último, era necesario encontrar un cultivo de células diana para la replicación y aislamiento vírico. En ese momento se hizo un gran esfuerzo para conseguir un sistema celular (células hematopoyéticas) capaz de resistir un largo período de tiempo en continuo crecimiento. En 1976 se descubrió un factor conocido

como interleucina-2 (IL-2) capaz de inducir un crecimiento prolongado en células de sangre periférica en cultivo (Morgan y cols., 1976; Poiesz y cols., 1980a).

En 1980, cultivando células procedentes de dos pacientes norteamericanos con formas agresivas de micosis fungoides y del síndrome de Sézari respectivamente, y gracias a la detección vírica mediante la actividad de la enzima transcriptasa inversa, se aisló el primer retrovirus humano (Poiesz y cols., 1980b; 1981). Más tarde se supo que estas dos enfermedades eran la misma, e igual a la leucemia/linfoma de células T de adulto (LLTA). Este primer retrovirus humano llamado HTLV-I (figura 1) es el agente etiológico de lo que se conoce actualmente como leucemia/linfoma de células T de adulto (LLTA), la cual se conocía clínicamente desde 1977 (Uchiyama y cols., 1977; Takatsuki y cols., 1977).

**TABLA I**  
**Clasificación de la Familia *Retroviridae***

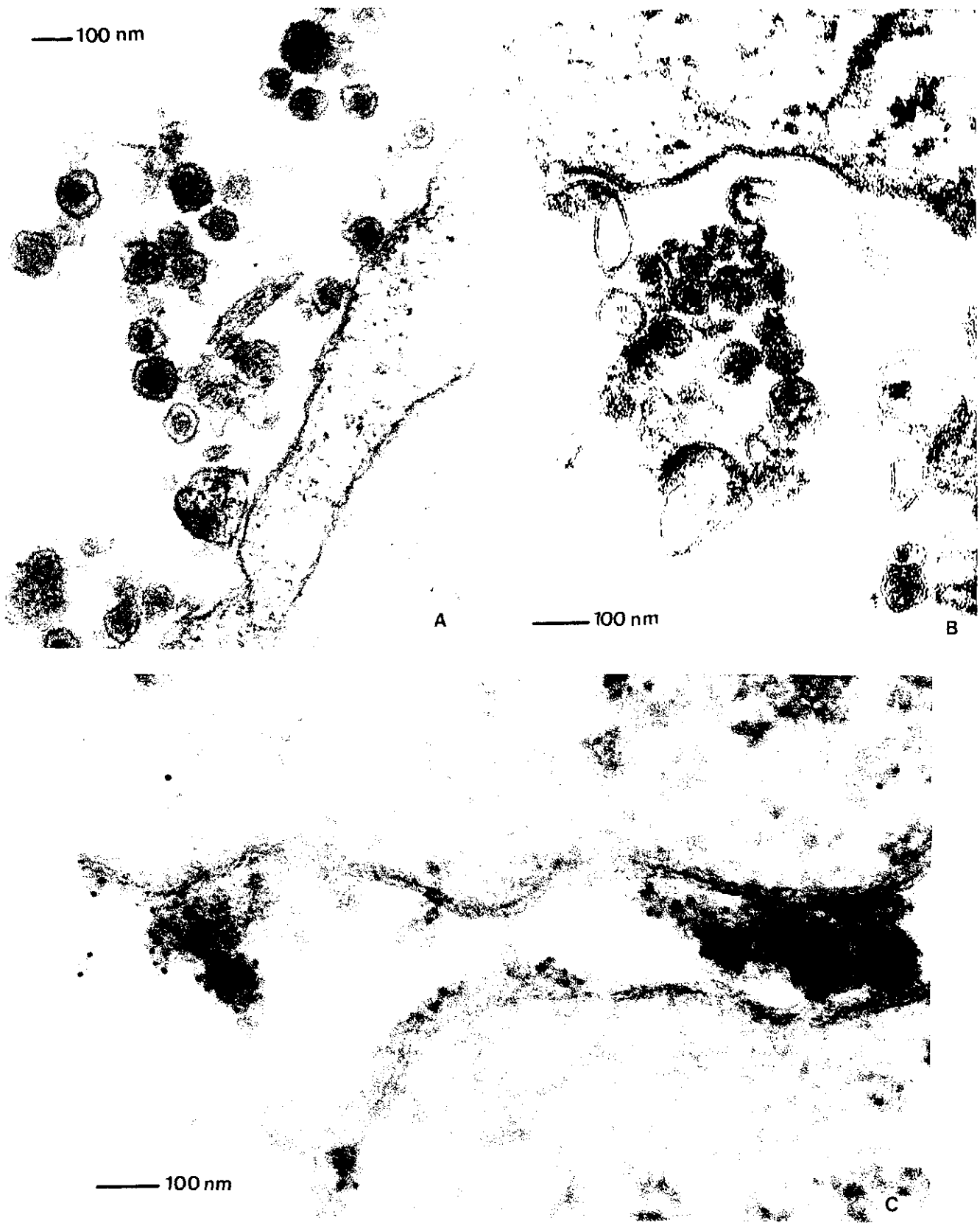
<b>Género</b>	<b>Especie tipo</b>
Oncovirus de tipo B de mamífero	Virus del tumor mamario de ratón (MMTV)
Virus relacionados con MLV	Virus de la leucemia murina (MLV)
Retrovirus de tipo D	Virus del mono Mason-Pfizer
Retrovirus de tipo C aviares	Virus de la leucosis aviar (ALV)
Virus espumosos	Virus espumoso
HTLV-BLV	Virus linfotrópico de células T humano de tipo I (HTLV-I) Otros: de tipo II (HTLV-II); virus linfotrópico de células T de simio (STLV); virus de la leucemia bovina (BLV).
Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIII-1)

Francki R.L. y cols. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. supp* 2:290-9.

Dos años después y utilizando anticuerpos contra proteínas de HTLV-I se pudo aislar otro retrovirus, altamente relacionado con éste, de células T de un paciente con una variante de leucemia de células peludas o tricoleucemia. A este segundo retrovirus humano se le llamó HTLV-II (Kalyanaraman y cols., 1982) (figura 1).

A principios de los años 80 se detecta una enfermedad que se caracteriza por una severa inmunosupresión y que afecta a las células T. Se tenían datos que apuntaban hacia una etiología infecciosa, aparentemente se transmitía por vía sexual y por productos sanguíneos. A esta enfermedad se la conoce hoy en día como SIDA y el agente causante se suponía que era un virus relacionado con HTLV-I. En 1983 se aísla un retrovirus asociado a linfadenopatías (Barré-Sinoussi y cols., 1983) y en 1984 se describe otro virus procedente de enfermos de sida al que denominaron HTLV-III, conocido en la actualidad como VIH-1 (Gallo y cols., 1984; Popovic y cols., 1984), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Posteriormente se identificaron virus relacionados en monos africanos (macacos) y en humanos de Africa occidental (este último se conoce como VIH-2) (Clavel y cols., 1986). La clasificación hasta ahora utilizada de los retrovirus en subfamilias (*oncovirinae*, *lentivirinae* y *spumavirinae*) se ha actualizado con la agrupación en siete géneros de la Familia *Retroviridae* (Francki y cols., 1991). La clasificación se esquematiza en la tabla I.



**Micrografía electrónica de partículas HTLV-I (A) y HTLV-II (B), así como inmunomarcado con AcMo anti-p19 HTLV del HTLV-I. Servicio de Microscopía Electrónica, CNBCR, ISCH.**

**Figura 1**

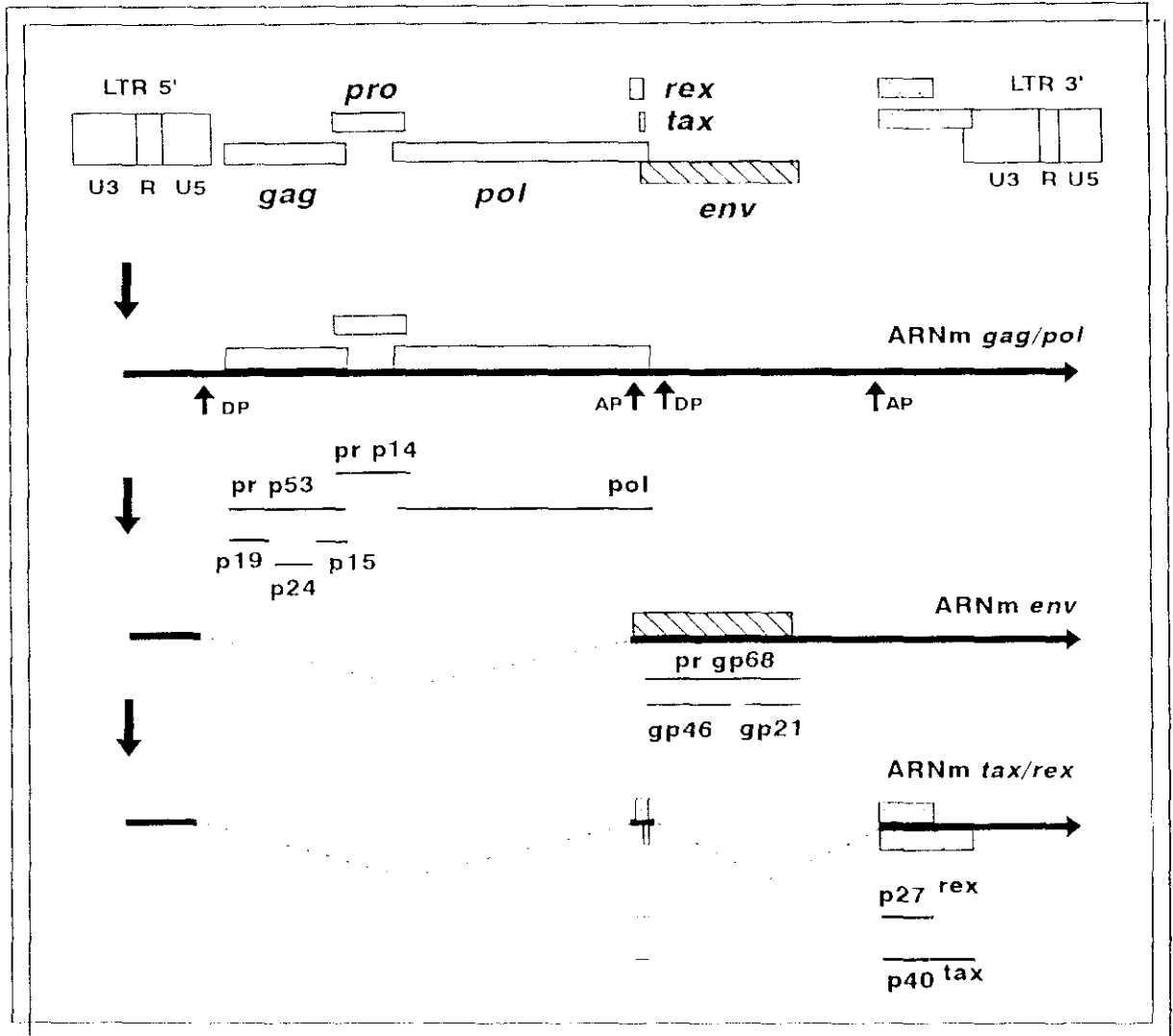
# 1. BIOLOGIA MOLECULAR

## 1.1 Estructura genética

La estructura genética del HTLV-I y del HTLV-II es muy parecida a la de otros retrovirus (Seiki y cols., 1983). Además de los genes característicos *gag*, *pol* y *env* hay una región en el extremo 3' del genoma que no se encuentra en otros retrovirus. En esta región se han identificado dos genes, *tax* y *rex* (Vallejo y García Sáiz, 1992).

El provirus transcribe para tres moléculas de ARNm distintos. Un ARNm de longitud completa, transcrito desde la zona de unión U3-R en la LTR 5'a la zona de unión R-U5 en la LTR 3', que se utiliza para la síntesis de los productos de los genes *gag* y *pol* y también como ARN genómico para la formación de nuevos viriones. Un ARNm subgenómico, donde se ha eliminado un intrón, codifica para el producto del gen *env*. Por último, un segundo ARNm subgenómico, con otro intrón eliminado, codifica para las proteínas *tax* y *rex*.

La estructura genética del HTLV-I y del HTLV-II y los ARNm transcritos se muestran en la figura 2. El genoma provírico está flanqueado en los extremos 5'y 3' por unas repeticiones largas no codificantes (LTR) divididas en regiones denominadas U3, R y U5. Una característica distintiva es que las porciones de las LTRs que proceden de U5 y U3 son largas, 174 y 224 pares de bases respectivamente. Otra característica no usual de las LTRs es que la señal de poliadenilación del ARN, AATAAA, esté aproximadamente 250 bases por encima de su posición esperada (Seiki y cols, 1983) y se supone que se aproximan en la estructura secundaria. Se propone que el transcrito ARN puede formar una estructura secundaria extensiva que podría llevar la señal AATAAA a una situación muy próxima al propio sitio de poliadenilación.



DP, sitio donador del procesamiento del mensajero; AP, sitio aceptor del procesamiento.

## Estructura genética de los HTLVs

Figura 2

La región U3 de las LTR 5' contiene secuencias (TRE) que son necesarias para el reconocimiento de p40<sup>tax</sup> (producto del gen *tax*) que produce una activación transcripcional *en trans* (Leider y cols., 1988; Montagne y cols., 1990). Por otro lado, la región que reconoce la proteína rex (RRE), necesaria para la regulación de los



procesamientos de los mensajeros víricos, está presente en la región U3 de las LTR 3' (HTLV-I) y en la región R/U5 de las LTR 5' (HTLV-II). La región U3 de las LTR contiene tres copias repetidas de una secuencia de 21 pb que actúan como potenciadores transcripcionales. Estas secuencias tienen homología a sitios NF-KB y AP-1, así como a sitios de reconocimiento al AMP cíclico (cAMP). Las LTR del HTLV-I pueden ser activadas por productos de los proto-oncogenes *c-jun* y *c-ets-1*, así como por mitógenos. Las LTR 5' también contienen secuencias responsables para la terminación y poliadenilación de los ARNm.

## 1.2 Productos génicos

El producto del gen *gag* es una poliproteína precursora compuesta por la p19 en el extremo amino terminal, la p24 en el centro y la p15 en el extremo carboxilo terminal, que es procesada por la proteasa vírica para producir las proteínas individuales que compondrán el core vírico de los HTLVs. Un ARNm vírico de 8.5 Kb codifica para *gag*, *pro* y *pol* en marcos de lectura solapantes. Un cambio ribosomal del marco de lectura producirá la síntesis de una poliproteína *gag-pro* precursora de 76 Kd que será autocatalíticamente cortada. Se requiere otro cambio ribosomal del marco de lectura para la expresión del gen *pol*. La relación de los productos génicos del HTLV-I y del HTLV-II se esquematizan en la tabla II.

La **proteasa**, p14, interviene en el procesamiento de los productos maduros de p55<sup>gag</sup> y p76<sup>gag-pro</sup>, con la posterior rotura autocatalizada para generar moléculas de proteasa maduras (Jacks y cols., 1985; Nam y cols., 1988). La proteasa del HTLV-I tiene una secuencia D-T-G idéntica a la aspartil-proteasa y el ácido aspártico es necesario para la actividad proteolítica. Datos posteriores obtenidos con inhibidores de la aspartil-proteasa indican que la proteasa vírica podría ser una aspartil-proteasa. Como el extremo 5' del gen *pol* se solapa con el gen de la proteasa, es necesario otro proceso de cambio de lectura ribosomal para poder expresarlo.

**TABLA II**

**Proteínas codificadas por los HTLV**

	HTLV-I	HTLV-II	Proteínas codificadas		Homología de secuencia
			HTLV-I	HTLV-II	
Provirus	9032 pb	8925 pb			
LTR	1-755 8278-9032	1-763 8504-8932			
gag	802-2089	807-2106	p19 MA p24 CA p15 NC	p19 MA p24 CA p15 NC	55% (nt) 85% (nt) 68% (nt)
Proteasa	2052-2755	2078-2611	p14 PR	178 aa	24% (nt)
pol	2497-5184	2239-5184	896 aa	982 aa	61% (aa)
env	5180-6643	5180-6637	pr (gp68) gp46 SU p21 TM	pr (gp62) gp35 SU p20 TM	63% (aa) 73% (aa)
Región no traducida	6644-7301	6641-7213			28% (nt)
tax	5180-5183 7302-8339	5180-5183 7214-8203	40 Kd	37 Kd	78% (aa)
rex	5124-5183 7302-7811	5121-5183 7214-7663	27 Kd 21 Kd	26 Kd 24 Kd	61% (aa)

MA, matriz; CA, cápsida; NC, nucleocápsida; pr, precursor; SU, superficie; TM, transmembrana.

La región que contiene el gen *pol* presenta el marco de lectura más largo del genoma de los HTLVs y es potencialmente capaz de codificar para 896 aa en el caso del HTLV-I ó 982 aa en HTLV-II. La proteína transcriptasa inversa (RT) de 95 Kd presenta tres actividades enzimáticas: RNasa H, integrasa y ADN polimerasa. La RT interviene en el proceso donde el ARN genómico de cadena simple pasa a ADN

provírico de doble cadena, que se integrará de una manera aleatoria en el ADN celular. Basado en la homología con otros retrovirus, la porción 5' del gen *pol* se predice que codifica para la proteína transcriptasa inversa y las secuencias alejadas por debajo codifican probablemente para las funciones integrasa y RNasa H. La transcriptasa inversa de los HTLVs funcionan más eficazmente usando  $Mg^{2+}$  en vez de  $Mn^{2+}$  como catión divalente. Los genes de la polimerasa de HTLV-I y HTLV-II muestran solo un 56% de homología, basado en sus secuencias de aminoácidos.

El gen *env* solapa parcialmente con el extremo 3' del gen *pol* y su producto es una poliproteína glucosilada de 61-69 Kd (Lee y cols., 1984; Schneider y cols., 1984) que procede de un ARNm de 4.2 Kb procesado una sola vez. Se han visto algunas formas relacionadas de alto peso molecular que son el resultado de la fusión anormal entre *env* y *tax* (por ejemplo, la gp68 de las células MT-2). Las proteínas precursoras de los HTLVs son procesadas para producir una glucoproteína de superficie gp46 y una proteína transmembrana p21 en HTLV-I y gp35 y p20 en HTLV-II.

Antes del brote del virus de la célula, la envuelta vírica tiene que estar presente en la membrana celular y tiene que haber sufrido un transporte intracelular hacia la superficie. Este transporte depende de la cantidad de proteína en el retículo endoplasmático, de los puentes disulfuro intracatenarios y de una correcta oligomerización de la proteína (Pique y cols., 1990). Las proteínas maduras de la envuelta migran independientemente y no covalentemente asociadas. Los procesos de maduración de las proteínas de la envuelta del HTLV-I no están todavía bien definidos. Debido a que la envuelta sólo presenta cinco sitios potenciales de glucosilación (Asn-X-Ser/Thr), la contribución de cada sitio podría ser determinante para el procesamiento del precursor (Pique y cols., 1992).

La envuelta del HTLV-I está muy conservada entre diferentes aislados. Los epítomos neutralizantes se centran en la región de la gp46 y un anticuerpo monoclonal contra gp46, 0.5-alfa, puede inhibir el efecto mitogénico de los viriones de HTLV-I inactivados sobre las células T humanas, indicando que gp46 puede interactuar con

moléculas de la superficie de las células T directa o indirectamente relacionadas con la activación de éstas. El extremo amino de la p21 contiene zonas homólogas con elementos inmunosupresores de otros retrovirus animales, pero carece de una secuencia hidrofóbica de fusión consenso (fenilalanina-leucina-glicina) asociada a la formación de sincitios.

La **región no traducida** consta de aproximadamente 600 nucleótidos y está localizada entre el final del gen *env* y el principio del tercer exón de los genes *tax* y *rex*. La homología de nucleótidos de esta región entre HTLV-I y HTLV-II es baja (28%) comparada con el resto del genoma. En HTLV-I, esta región presenta un marco abierto de lectura, sin embargo, en HTLV-II existen codones de terminación en el marco de lectura equivalente.

Los genes *tax* y *rex* son los únicos que codifican para proteínas no estructurales, transcritos a un ARNm de 2.1 Kb doblemente procesado y con tres exones (Haseltine y cols., 1984; Nagashima y cols., 1986; Faller y cols., 1988) y traducidos en marcos de lectura alternativos. El codón de iniciación (metionina) del gen *tax* es el mismo que para *env* y está dentro del segundo exón del ARNm *tax/rex*. El codón de iniciación para la proteína *rex* está también dentro del segundo exón pero 59 nucleótidos por encima. Las dos están localizadas en el núcleo de las células infectadas, en una región llamada matriz nuclear (Goh y cols., 1985). Las proteínas *tax* (p40<sup>tax</sup> en HTLV-I y p37<sup>tax</sup> en HTLV-II) son activadoras transcripcionales que actúan en trans e incrementan el grado de iniciación de la transcripción desde el promotor localizado en la LTR 5' del genoma provírico (Sakurai y cols., 1992). La proteína *tax* no se une directamente a los elementos potenciadores de 21pb en las LTR sino que parece estar asociada al ADN interactuando con proteínas celulares que se unen a ADN. Es capaz de activar promotores heterólogos de muchos genes que intervienen en el crecimiento y la diferenciación celular, como por ejemplo el promotor de los genes que codifican la IL-2 y el IL-2Ralfa, el CD3, el promotor del gen para el GM-CSF, el promotor c-fos y c-sis y el potenciador de SV40. *Tax* podría tener un importante papel en la inducción de la enfermedad y en el origen de la

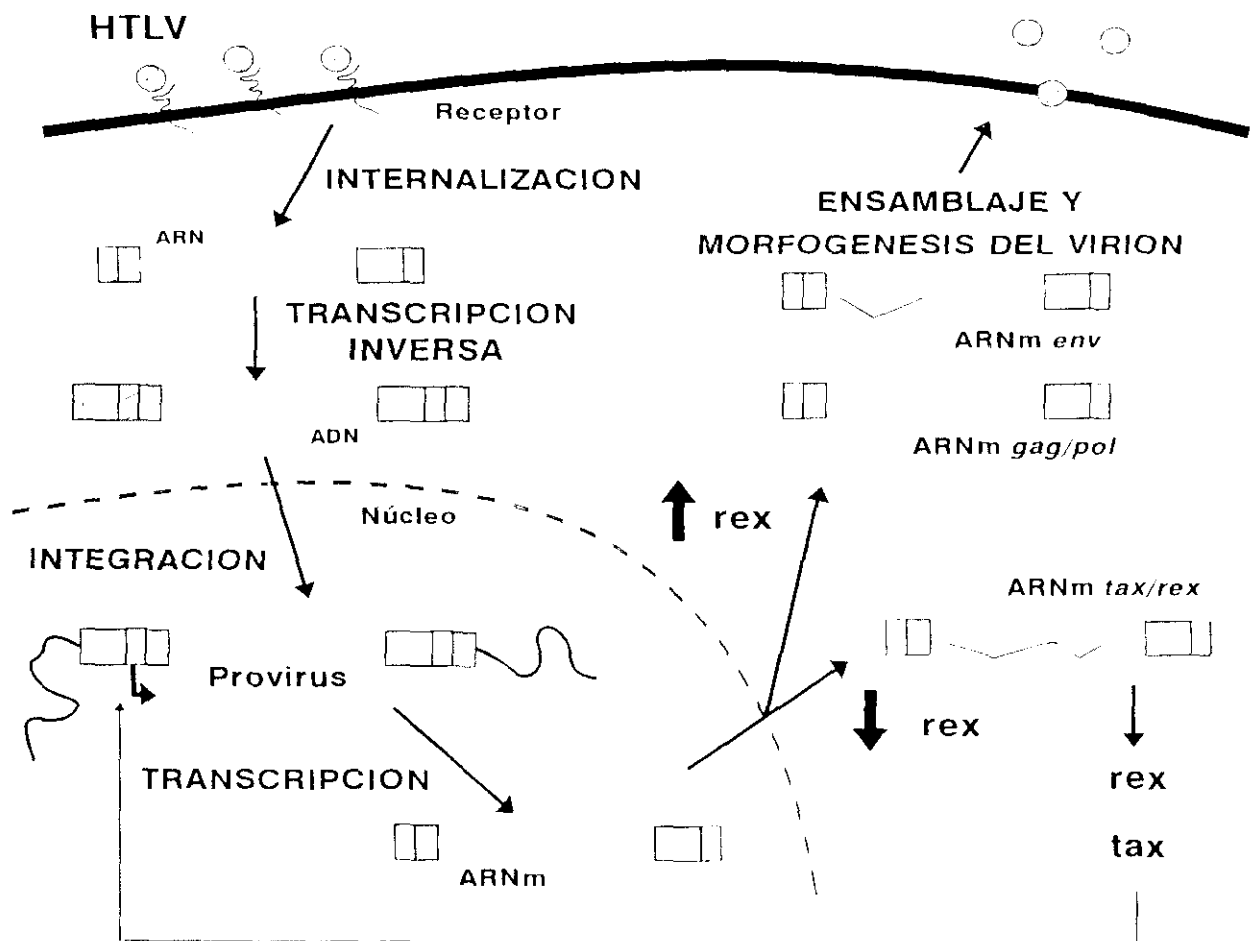
leucemia aunque los procesos de transformación no han sido todavía bien definidos.

El gen *rex*, solapado parcialmente con el gen *tax* pero que presenta un marco de lectura alternativo, codifica para dos proteínas que se localizan en el núcleo de células infectadas, p27<sup>rex</sup> y p21<sup>N</sup> para HTLV-I y p26<sup>rex</sup> y p24<sup>N</sup> para HTLV-II. Las proteínas p27<sup>rex</sup> y p26<sup>rex</sup> intervienen en la activación del transporte de los ARNm no procesados o parcialmente procesados del núcleo al citoplasma. Las secuencias que reconocen a la proteína *rex* (RxRE) en HTLV-I están localizadas en la región U3/R de la LTR 3' y en R/U5 de la LTR5', y en HTLV-II está localizada en la región R de la LTR5', por debajo del sitio donador del procesamiento (DP). La proteína *rex* se une directamente a estas regiones y a regiones que reconocen a la proteína *rev* del VIH-1. *Rex* puede reemplazar funcionalmente a la proteína análoga *rev* del VIH-1, pero no viceversa (Sakai y cols., 1990; McDonald y cols., 1992). La función de las proteínas p21<sup>N</sup> y p24<sup>N</sup> es hasta ahora desconocida. Recientemente se ha descrito un nuevo ARNm capaz de expresar específicamente la proteína p21<sup>N</sup> en muchas líneas celulares infectadas por HTLV-I (Orita y cols., 1991; Hammes y cols., 1993). Este mensajero contiene solo el primer y tercer exón del ARNm *tax/rex* con lo que solo puede codificar para p21<sup>N</sup>. La expresión constitutiva del ARNm p21<sup>N</sup> indica que el mecanismo que regula su expresión es diferente del que regula la expresión del ARNm *tax/rex*, del ARNm *env* y del ARNm genómico/*gag-pol* (Orita y cols., 1992).

### 1.3 Regulación de la expresión génica

En el estado temprano de la replicación vírica, todos los ARNm son procesados rápidamente hasta el ARNm *tax/rex*, debido a que no hay *rex* disponible. Por tanto, empiezan a subir los niveles de *tax* y *rex* mientras que las otras proteínas víricas no son producidas. La proteína *tax* sigue transactivando la transcripción génica vírica (figura 3) produciendo más ARN vírico.

En este estadio, tax también activa los promotores de IL-2, IL-2Ralfa y GM-CSF induciendo a la proliferación de las células T infectadas (McGuire y cols., 1993). Entonces, la proteína rex acumulada, empieza a modular los sucesivos mecanismos de procesamiento del ARN, dando como resultado la aparición del ARNm pol/gag y el ARNm env, produciéndose así las proteínas estructurales, lo que favorece la formación de nuevos viriones (maduración)(Hidaka y cols., 1988). Por eso, rex es un producto génico temprano que estimula la expresión de las proteínas del virión en la fase tardía de la expresión génica.



**Ciclo biológico del HTLV-I y función de tax y rex en la regulación de la transcripción**

**Figura 3**

La acumulación de rex se traduce en un acumulo de ARN genómico y, por tanto, en un corte en proceso de transcripción de genes víricos (Green y cols., 1991). Parece ser que la secuencia RxRE del HTLV-II contiene elementos negativos intrínsecos que mantienen al ARN en el núcleo (Kim y cols., 1991). La eficiencia en la unión de rex depende de la estructura secundaria del ARN, en concreto del bucle localizado entre los nucleótidos 465 y 500, y de secuencias específicas en ese ARN (nt 470 a 476) y de un sitio donador del procesamiento (nt 449 a 455)(Black y cols., 1991). Por eso, la función de rex sería liberar el efecto negativo de esta secuencia y permitir al ARN distribuirse en el citoplasma. Esto sería un efecto regulador positivo que no afecta los valores totales de ARN, pero que a altas concentraciones de rex, los niveles de ARNm decrecen debido a un decaimiento en la iniciación de la transcripción o por debilitamiento en la estabilidad del ARN.

Por tanto, la regulación de la transcripción la llevan a cabo dos proteínas, tax y rex, que proceden de un mismo ARNm (hecho que no ocurre con las proteínas reguladoras del VIII que proceden de ARNm diferentes). Cuando la expresión génica se reduce, la proliferación de las células T decrece, llegando a un estado de reposo (Haseltine y cols., 1990). Una expresión transitoria de los genes víricos resulta en una producción transitoria de progenie vírica y promoción del crecimiento de las células infectadas. Ésta podría ser una estrategia de supervivencia ante la respuesta inmune del hospedador.

#### **1.4 Mecanismos de transformación**

La infección de linfocitos periféricos o de cordón umbilical por HTLV-I o HTLV-II da como resultado una producción de virus y una *inmortalización* de las células. La proliferación policlonal de las células infectadas puede llevar a un mayor crecimiento de un clon de células transformadas dominante que contendría un provirus monoclonalmente integrado. Los sitios de integración monoclonal son distintos entre diferentes pacientes. Por eso, la activación en cis insercional de

oncogenes celulares por las LTR víricas no parece ser operativo. Además, existe daño cromosómico asociado con la integración provírica, pero no hay evidencias de un patrón de traslocación cromosomal indicando que la cis-activación de oncogenes celulares por promotores víricos o celulares no es evidente.

Las preparaciones víricas, procedentes de sobrenadantes de cultivos de células infectadas por HTLVs, son mitogénicas para las células T humanas (Duc Dodon y cols., 1987; Gazzolo y cols., 1987; Zack y cols., 1988). Se estimulan para dividirse tanto las CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>, y además, no se requiere la presencia de las células accesorias (monocito/macrófago). Esta actividad mitogénica no requiere infección porque se ha visto que cuando se inactiva el virus por calor aparece el mismo efecto. Una función importante de esta actividad mitogénica es la de capacitar al virus para el establecimiento de la infección una vez que ha penetrado en la célula. Se piensa que una célula activada y en división es más fácilmente transformada por el virus que una en estado de reposo (Merl y cols., 1984).

Sólo las células T son susceptibles de transformación celular, sin embargo, en muchas ocasiones las líneas de células B transformadas por EBV son productivamente infectadas por HTLVs (fundamentalmente por HTLV-II) (Yamamoto y cols., 1982; Koyanagi y cols., 1984; Wiktor y cols., 1991) y células inmaduras de médula ósea (sin fenotipo de célula T) también son susceptibles a la infección. La transformación celular se define como una proliferación celular continua en ausencia de factores de crecimiento exógenos, como la IL-2.

Las células transformadas por los HTLV muestran fenotipos típicos y marcadores de superficie asociados con células T activadas funcionalmente (por antígenos o lectinas) (Koizumi y cols., 1992). Además de proliferación, esto incluye una producción de una amplia gama de linfocinas y una expresión alterada de marcadores de superficie (marcadores asociados a un estado activado), como IL-2R, receptor de la transferrina y ciertos antígenos HLA. La transformación podría incrementar el número de células portadoras de virus dentro de un individuo y ello



incrementaría sus posibilidades de expansión entre distintos individuos. Considerado como tal, la transformación de las células T por los HTLVs es un proceso normal en el ciclo biológico del virus, al contrario que otros retrovirus oncogénicos, donde la transformación y replicación pueden ser disociadas y donde la transformación es una consecuencia no deseada de la infección. Recientemente se ha visto un alto nivel de ADN vírico asociado a linfocitos anormales entre portadores asintomáticos (Tachibana y cols., 1992).

El mecanismo por el cual se produce leucemia no se conoce aún en profundidad. Ninguno de los dos virus presenta en su genoma ningún oncogen clásico, sin embargo, contienen genes no estructurales que se requieren para la replicación vírica. Estos genes, llamados tax y rex, están muy relacionados en los procesos de transformación celular. Se ha postulado que estos genes, que son trans-activadores, causan la transformación de las células T induciendo la expresión aberrante de genes celulares normales. La proteína tax puede trans-activar los genes de la interleucina-2 (IL-2) y la de su receptor (IL-2R). Aunque esto sugiere que tax induce la transformación vía producción IL-2/IL-2R autocrina, que induce la proliferación policlonal de células T asociado a una integración provírica aleatoria, existen líneas celulares transformadas por HTLV que no secretan ni requieren IL-2 para su crecimiento continuado (Yip y cols., 1990; Hjelle y cols., 1992). Por eso, se están estudiando otros genes reguladores hematopoyéticos que puedan ser expresados de manera anormal en respuesta a proteínas del HTLV. Estudios preliminares indican que el factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGFB), que no se expresa en las células normales (células T quiescentes), se expresa constitutivamente en las células T transformadas por HTLV. Además, el TGFB exógeno, que normalmente inhibe la proliferación de las células T inducidas por IL-2 y la inducción del receptor IL-2, no influye en el crecimiento de las células T transformadas. Esto sugiere que la biología de este factor en las células transformadas es diferente al de las células normales.

Existen evidencias que muestran que, al contrario que las células normales, las células transformadas por HTLV secretan el factor TGF $\beta$ . Además, la secuenciación de las regiones reguladoras en 5' en el gen del TGF $\beta$  ha identificado numerosos sitios consenso que unen factores reguladores transcripcionales, algunos conocidos por ser transactivados por el producto del gen tax de los HTLVs. Por eso, la expresión inducida en las células transformadas por HTLV, directa o indirectamente por un producto génico de los HTLVs, podría ser un factor importante en los procesos de leucemia inducida por HTLV.

Además, el TGF $\beta$ 1 es un mediador potencial de la patología relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que el TGF $\beta$ 1 se sobreexpresa en los linfocitos de sangre periférica (PBMC) infectados por VIH. Diversos estudios señalan un incremento de la actividad TGF $\beta$  en PBMCs de pacientes con SIDA, lo que podría indicar que este factor interviene en las disfunciones inmunológicas de estos pacientes. Parece que este factor media en las disfunciones de las células T, células B y monocitos infectados por VIH-1. Todo esto conduce a pensar que el TGF $\beta$  podría ser usado como indicador pronóstico en individuos infectados por VIH y si que podría jugar algún papel en la neuropatogénesis del VIH.

## 2. BIOLOGIA

### 2.1 Actividad biológica *in vivo* e *in vitro*

El HTLV-I y el HTLV-II tienen un amplio rango de células hospedadoras *in vitro* y posiblemente también *in vivo* (Macchi y cols., 1987). La infección por HTLVs necesita un contacto directo célula-célula, por eso, la infección *in vitro* se realiza mediante cocultivo de células normales con células productoras de virus (Farouqi y cols., 1992). Sin embargo, se ha descrito la infección por HTLV-I libre de células en células mononucleares de sangre periférica y en líneas celulares (Fan y cols., 1992).

Se ha descrito que el HTLV-I puede infectar células endoteliales *in vitro* y que éstas podrían actuar como reservorio vírico *in vivo*. El HTLV-I libre de células puede infectar células endoteliales pero no a células linfoides, es así como células endoteliales infectadas podrían infectar células CD4 en etapas tardías *in vivo* (Hoxie y cols., 1984). Esto podría explicar el incremento de la incidencia de seroconversión con la edad.

### 2.2 Receptores celulares

El receptor celular para los HTLVs no está bioquímicamente identificado pero se ha demostrado que existe en muchos tipos de células humanas y de animales, incluyendo primates, perros, gatos y roedores. Una característica de las células que expresan receptores víricos en su superficie es la capacidad de fusionarse con células infectadas para formar células gigantes multinucleadas, conocidas como sincitios (Miyamoto y cols., 1991).

Las células crónicamente infectadas expresan glucoproteínas víricas que enmascaran o modulan negativamente la expresión del receptor en la superficie

celular, produciendo una resistencia celular a la superinfección por otros virus que compartan el mismo receptor. A este fenómeno se conoce como interferencia del receptor y se ha usado para demostrar que el HTLV-I y el HTLV-II usan el mismo receptor, mientras que el receptor del BLV es claramente distinto. El uso de líneas celulares híbridas de humano-ratón ha permitido asignar al cromosoma 17 la localización del gen del receptor de los HTLVs (Sommerfelt y cols., 1989).

### 2.3 Patologías asociadas

La leucemia/linfoma de células T de adulto (LLTA) está causada por el HTLV-I y presenta varios estadios: a) estado de portador asintomático, b) estado preleucemico (pre-LLTA), c) estado crónico de LLTA y d) estado agudo. El provirus puede estar integrado en células T con un patrón monoclonal u oligoclonal (Minamoto y cols., 1988; Pombo de Oliveira y cols., 1990). El estudio de los distintos sitios de integración vírica en distintos pacientes con LLTA demuestra que éstos son distintos y están presentes en cromosomas diferentes. Por lo tanto, la integración del HTLV-I es aleatoria y no da ninguna pista sobre el mecanismo de oncogénesis ya que otros retrovirus tienen sitios de integración cercanos a secuencias oncogénicas celulares (Yoshida y cols., 1982). Las células infectadas in vivo generalmente no expresan proteínas víricas (incluida tax). Además, la historia natural del desarrollo de LLTA aguda, sugiere que la infección por HTLV-I sólo no es suficiente para producir leucemia (Aboud y cols., 1992). Mucha gente infectada no desarrolla LLTA y quienes lo hacen (1-5%), han tenido un período de latencia de 20-30 años. La fosfoproteína nuclear p53 puede actuar como supresor tumoral y se ha visto que existen alteraciones del gen p53 en la LLTA aguda. Una posible hipótesis con respecto al desarrollo de LLTA puede establecerse de la siguiente manera: la infección por HTLV-I produce una expresión aguda de tax, quizá por una estimulación del crecimiento autocrina a través de la producción de IL-2. Esta estimulación podría causar una expansión policlonal de linfocitos T infectados. La evolución al estado agudo implicaría la alteración mutacional del gen p53 (Takasaki

y cols., 1977; Sakashita y cols., 1992; Tsukasaki y cols., 1993).

La **mielopatía asociada a HTLV-I (MAI)/Paraparesia espástica tropical (PET)** son enfermedades neurológicas estrechamente relacionadas - si no iguales - y producidas por el HTLV-I (McKhann y cols., 1989; Smith y cols., 1993). La presencia de anticuerpos intratecales indican que el virus ha infectado el sistema nervioso, además de la sangre (Roman y cols., 1990; Sowa y cols., 1992; Lunardi y cols., 1993; Shimada y cols., 1993). Al contrario que en la LLTA, los sitios de integración son policlonales, por eso, el desarrollo de MAI no es una consecuencia del desarrollo de clones celulares malignos (Furukawa y cols., 1992). Existe la hipótesis de que el desarrollo de MAI esté basado en modelos autoinmunes (Minagawa y cols., 1992).

Otras enfermedades relacionadas con HTLV-I son la **leucemia linfocítica crónica de células B (B-cell CLL)**, la **esclerosis múltiple (EM)**, el **síndrome de Sjögren** y el **lupus eritematoso sistémico (LES)** (Higashi y cols., 1992).

Por otro lado, la patología asociada a HTLV-II es una hemopatía conocida como **tricoleucemia** (Kalyanaraman y cols., 1982; Rosenblatt y cols., 1986), pero realmente no se conocen todavía los mecanismos patogénicos de la enfermedad. A pesar de la relativamente alta seroprevalencia de HTLV-II entre drogadictos por vía parenteral, el papel patogénico de este retrovirus no ha sido aún identificado. Recientemente, el Registro de Tumores de Nuevo Méjico obtuvo datos que no muestran evidencia de un incremento del riesgo para tricoleucemias, *micosis fungoides* o leucemias linfocíticas crónicas en grupos endémicos para la infección por HTLV-II (Hjelle y cols., 1991; Zucker-Franklin y cols., 1992).

Se ha podido detectar el HTLV-II en un paciente con **leucemia linfocítica granular (LGL)** (Lougharan y cols., 1992) y *micosis fungoides* (Hjelle y cols., 1991). Hay casos de enfermedades neurológicas, parecidas a MAI/PET, en individuos infectados por HTLV-II (Hjelle y cols., 1992).

### 3. EPIDEMIOLOGIA

#### 3.1 Diagnóstico de la infección

##### Detección de anticuerpos

La infección está definida por la presencia de anticuerpos específicos anti-HTLV, por eso hay una serie de técnicas desarrolladas para la detección de éstos. No existe reacción cruzada de las proteínas del grupo de los HTLVs con ninguna de las proteínas de los otros grupos de retrovirus de mamíferos, sin embargo existen reacciones cruzadas entre los propios miembros del grupo. La p24 parece tener la mayor reactividad cruzada entre el HTLV-I y el HTLV-II (Kalyanaraman y cols., 1984); por el contrario, la p19 tiene mucha menos homología.

Las proteínas víricas principalmente reconocidas por el suero de individuos infectados son aquellas producidas por los genes *gag*, *env* y *tax* (Goh y cols., 1985). Como en todos los retrovirus, las proteínas *gag* de mayor peso molecular son las más inmunogénicas. Los anticuerpos contra la envuelta podrían ser importantes en la modificación del curso de la infección, aunque la seroconversión y el desarrollo de inmunidad humoral no conduce a la eliminación de la infección vírica.

El diagnóstico de la infección por HTLV-I y HTLV-II requiere la capacidad de detección vírica y la capacidad de discriminación entre los dos tipos víricos (Kinoshita y cols., 1984). Existen dos tipos principales de enzimoimmunoensayos (ELISA), uno que utiliza un lisado vírico completo como antígeno en fase sólida y otros que incorporan en el lisado vírico péptidos sintéticos de secuencia determinada. Los primeros no diferencian entre anticuerpos HTLV-I o HTLV-II, sin embargo, los segundos, al utilizar péptidos de las proteínas del core o de la envuelta con dominios inmunorreactivos tipo específicos, pueden llegar a discriminar entre ellos (Lal y cols., 1991; Hjelle y cols., 1991; Goubau y cols., 1993; Rudolph y Lal, 1993). La

identificación de epítomos inmunodominantes en las proteínas gag, pol o env de HTLV-I y HTLV-II es fundamental para la realización de inmunoensayos basados en péptidos sintéticos (Lal y cols., 1991a; 1991b; 1992). Los equipos comerciales de ELISA varían en el grado de especificidad y sensibilidad, por eso hay realizados muchos estudios comparando la detección de anticuerpos específicos con el fin de valorar la eficacia de dichos equipos (Kline y cols., 1991; Cossen y cols., 1992).

Los ensayos de confirmación de los repetidamente reactivos en ensayos de ELISA son el western blot (WB), cuyos criterios de interpretación recomendados por la OMS se esquematizan en la tabla III (WHIO, 1990), inmunofluorescencia (IFI) y la radioinmunoprecipitación (RIPA). Los ensayos de WB hasta ahora tampoco podían diferenciar los dos tipos de virus, sin embargo, se están incorporando proteínas recombinantes tipo específicas que sí lo hacen.

**TABLA III**  
**Criterios de interpretación del ensayo de WB para HTLV-I/II**

<b>Positivo</b>	1 banda en env (gp46 y/o gp61/68) y 1 banda en gag (p24)
<b>Negativo</b>	Sin bandas específicas
<b>Indeterminado</b>	Otros perfiles no considerados como positivos o negativos

Algunas de estas proteínas recombinantes utilizadas proceden de la glicoproteína de la envuelta gp46 del HTLV-I (RP-B1 residuos 166-201, MTA-4 residuos 129-203, MTA-1 residuos 162-209), que sólo reaccionan con sueros positivos para HTLV-I, y de la glicoproteína de la envuelta del HTLV-II (RP-IIB residuos 96-

235, GH2-K15 residuos 157-205, GH2-K55 residuos 162-205) (Chen y cols., 1990; Lipka y cols., 1992; Roberts y cols., 1993).

Personas con un perfil indeterminado por WB están raramente infectadas por cualquiera de los virus, y en las que sí lo están, la repetición de los ensayos frecuentemente demuestra reactividad (Khabbaz y cols., 1992). Hay estudios realizados con IFI utilizando células MT-2 (HTLV-I) y Mo-T (HTLV-II) en los que se observa una diferencia significativa de reactividad con sueros positivos para HTLV-I o para HTLV-II (Gallo y cols., 1991). Sin embargo, no todos los sueros positivos pueden ser tipificados como HTLV-I o HTLV-II usando estos ensayos. En estos casos es necesario el uso de otras técnicas como la PCR o el aislamiento vírico.

### **Detección de antígeno**

Existen varios métodos de detección de proteínas específicas entre los que destacan ensayos inmunoenzimáticos (EIA) que detectan fundamentalmente la p24 de los HTLVs, la IFI utilizando anticuerpos monoclonales o suero de pacientes seropositivos y la microscopía electrónica (ME) que ayuda a establecer la morfología de la partícula vírica. Otro tipo de detección de antígeno se realiza mediante la medida de actividad enzimática de la proteína transcriptasa inversa (RTA).

### **Detección de ácidos nucleicos**

El procedimiento más sensible para la detección de material genético es el de la amplificación mediante la técnica llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Duggan y cols., 1988; Abbott y cols., 1988). Se utilizan un par de oligonucleótidos que flanquean una región del genoma vírico para que en posteriores rondas de hibridación, polimerización y desnaturalización, se obtenga al final una amplificación exponencial de la secuencia flanqueada por estos oligonucleótidos, permitiendo así una más fácil detección del material genético (Ehrlich y cols., 1989; Heneine y cols., 1992a; Tuke y cols., 1992; De Montalembert y cols., 1993). El mayor



problema de estos métodos es la aparición de falsos positivos por contaminación en el momento de la manipulación de la muestra (Kwok y cols., 1990).

Otro método de detección de ácidos nucleicos es la **hibridación *in situ*** en la que se utilizan sondas marcadas específicas sobre células infectadas sembradas en un portaobjetos.

### **Aislamiento**

En casos de resultado indeterminado por las técnicas serológicas antes mencionadas, se realiza una extracción de células mononucleares (PMNCs) del paciente y se mantienen en cocultivo con PMNCs de donantes durante 3-5 semanas, permitiendo así la replicación y expansión del virus (Hall y cols., 1992). El virus puede ser detectado entonces en estos cultivos por EIA p24, IFI, PCR o hibridación *in situ*. La desventaja de este método es que el cultivo *in vitro* de las células es un proceso largo que no permite un diagnóstico clínico rápido.

### **3.2 Modos de transmisión**

Los mecanismos de transmisión del HTLV-I son principalmente los siguientes (Murphy y cols., 1990):

**Perinatal:** las madres infectadas pueden transmitir el virus al feto o al neonato, siendo el modo de transmisión a través del desplazamiento transplacentario de linfocitos maternos infectados (Fugino y cols., 1992; Ueda y cols., 1993), o a través de linfocitos infectados localizados en la leche materna (Narita y cols., 1989; Ando y cols., 1989; Nagamine y cols., 1991). La eficiencia de transmisión del HTLV-I a niños alimentados con leche materna es de 15-25% (Sugiyama y cols., 1986; Heneine y cols., 1992b). En un estudio de transmisión vertical en madres infectadas por HTLV-II no se encontró evidencia de transmisión en los hijos que no se alimentaron

con leche materna (Kaplan y cols., 1992). Esto indica un bajo riesgo de transmisión del HTLV-II de madre a hijo, sin embargo, la coinfección con VIH facilita la transmisión del HTLV-II. La transmisión perinatal del HTLV-I en ausencia de lactancia es también rara (Ando y cols., 1987). Un estudio de transmisión de HTLV-I encontró un 5% de hijos de madres seropositivas que presentaban la infección (Takahashi y cols., 1991; Hirata y cols., 1992).

**Sexual:** El HTLV-I puede ser transmitido homo o heterosexualmente a través de células infectadas (Chen y cols., 1991; Stuver y cols., 1993). La mayor eficiencia de infección es de hombre a mujer, lo que podría explicar el incremento relacionado con la edad en la prevalencia de infección en las mujeres, siendo la mayoría de las portadoras mayores de 30 años (Kajiyama y cols., 1986). Un estudio realizado en Japón sobre la eficiencia de infección de hombre a mujer, determinó un 60.8% en un período de 10 años. En un estudio similar realizado en un período de 10 años, estimó en menos del 1% la eficiencia de transmisión de mujeres a hombres. En Estados Unidos, aproximadamente un 25-30% de las parejas sexuales de seropositivos son también seropositivos (Kleinman y cols., 1990). Existen evidencias de transmisión sexual del HTLV-II puestas de manifiesto en un estudio entre mujeres donantes de Estados Unidos, que mantenían contactos sexuales con parejas ADVP (Hjelle y Cyrus, 1992).

**Parenteral:** la transmisión por transfusión o por uso de drogas por vía intravenosa ha sido muy estudiada en Japón y en los Estados Unidos. La transmisión puede producirse a través de productos derivados de la sangre, pero, al contrario que para VIH, sólo productos sanguíneos con células pueden transmitir el virus eficientemente (Herr y cols., 1993; Kleinman y cols., 1993). La tasa de seroconversión se estima en 40-60% en los receptores de componentes celulares infectados (Mann y cols., 1992). La transmisión entre población drogo-dependiente se realiza a través de la inoculación de células infectadas localizadas en las agujas compartidas (Zella y cols., 1990).

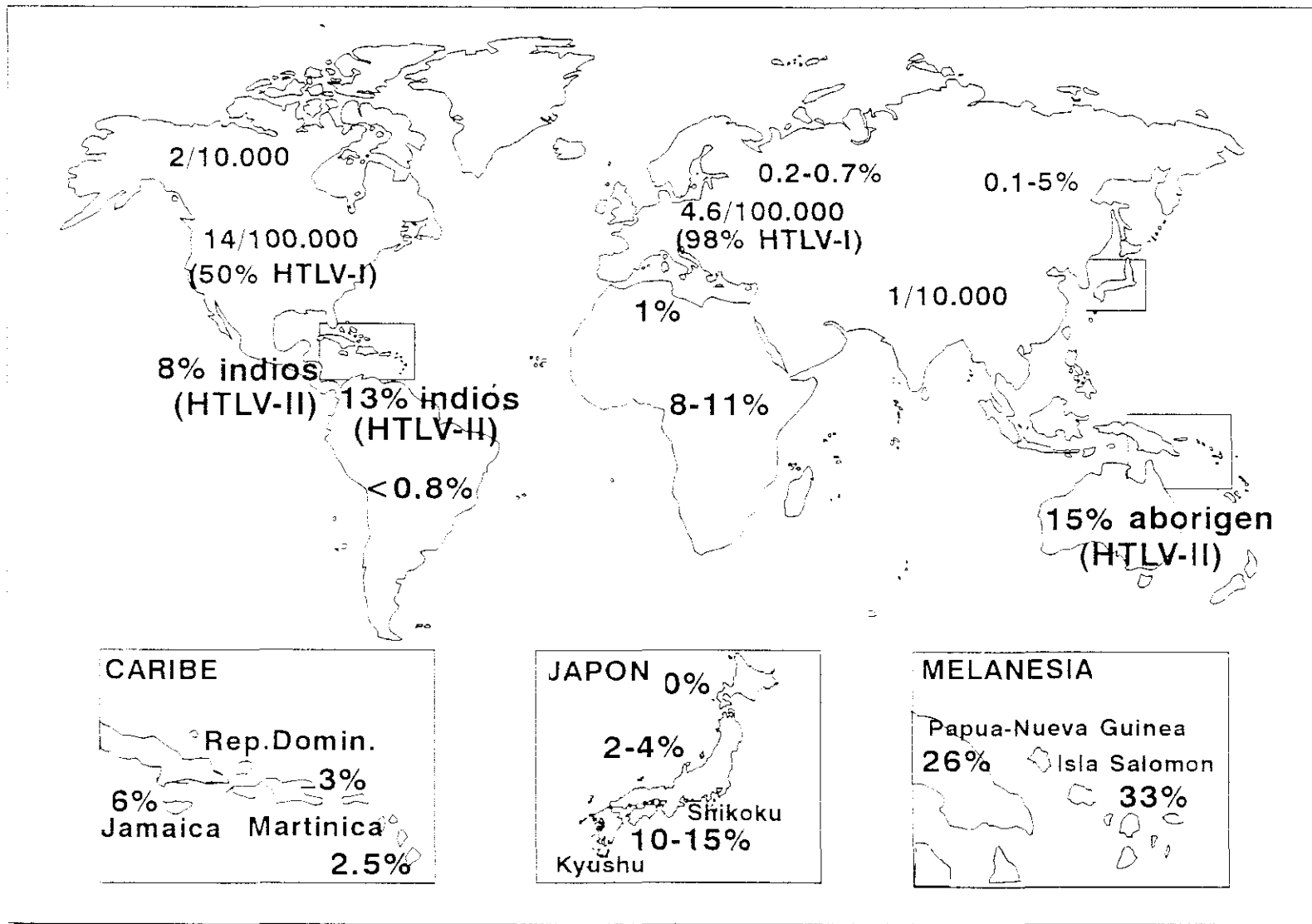
### 3.3 Distribución geográfica

Hasta ahora se asumía que la prevalencia de infección era debida a HTLV-I más que a HTLV-II, que se pensaba era menos común. Hoy en día se dispone de ensayos serológicos y moleculares que permiten distinguir entre una u otra infección, lo que hace posible tener una idea más exacta de la distribución de éstas. Cada vez son más los estudios relacionados con la epidemiología del HTLV-II (Mann y Blattner, 1991). Así, las zonas endémicas principales son Japón, Caribe y Africa Central (Blattner y cols., 1983; WHO, 1989; Delaporte y cols., 1991), pero éstas se están ampliando hacia Norteamérica, Centro y Suramérica (Asher y cols., 1988; Reeves y cols., 1990; Constantine y cols., 1991; Ramirez y cols., 1991; ; Inostroza y cols., 1991; Lombardi y cols., 1991), Melanesia y Australia (figura 4).

En la zona del Caribe se han realizado numerosos estudios de seroprevalencia. En población general de Jamaica se ha detectado hasta un 6% de seropositividad en población general (Murphy y cols., 1991), cerca de un 3% en República Dominicana, y un 2.5% en Martinica (Vernant y cols., 1987). Los datos disponibles indican que la seropositividad está asociada con las clases socioeconómicas más bajas. En la isla de Trinidad se ha encontrado una prevalencia de 3.7%, limitada casi exclusivamente a individuos descendientes de africanos.

En Asia la mayor prevalencia de HTLV-I se localiza principalmente en las islas Kyushu, Shikoku y Okinawa (Japón) donde se alcanza hasta un 15% de prevalencia.

Ciertas zonas de Africa parecen tener reservorios de infección por HTLV-I. Se han detectado posibles zonas endémicas dentro de Gabón, Chad, Benin, República Centroafricana y Zaire. Un estudio en Costa de Marfil y en Zaire (Wiktor y cols., 1990) encontró alta prevalencia entre prostitutas, lo que sugiere que los contactos sexuales frecuentes podrían aumentar el riesgo de adquirir la infección. Por otra parte, existen evidencias de infección por HTLV-II en Africa Central (Delaporte y cols., 1991; Dumas y cols., 1991).



Distribución geográfica de los HTLV

Figura 4

Entre población aborigen de **Australia** se ha detectado un 8-15% de infección por HTLV-II. En población general se ha detectado hasta un 26% en Papúa-Nueva Guinea, y un 33% en Islas Salomón, debido a infección por HTLV-I (Bastian y cols., 1993). Sin embargo, la existencia de una zona endémica de HTLV-I específica de Melanesia, sigue cuestionada (Weber y cols., 1989).

En **Estados Unidos** la detección de anticuerpos específicos en donantes de sangre es obligatoria desde noviembre de 1988 (CDC, 1988). Se ha visto que entre población general la prevalencia se sitúa entre 0.02% y 0.08%, según las regiones (Williams y cols., 1988). Al menos la mitad de los donantes seropositivos en Estados Unidos están infectados por HTLV-II, como lo demuestran estudios por PCR. Se ha visto que entre los donantes positivos muchos han nacido o tienen contactos sexuales con personas nacidas en países endémicos para HTLV-I. Las zonas con mayor prevalencia se sitúan en Nuevo Méjico y Florida donde hay una alta incidencia de HTLV-II (Hjelle y cols., 1990; Khabbaz y cols., 1991). Entre los ADVP, hasta el 49% están infectados (Lentino y cols., 1991) y más del 80% de éstos lo están por HTLV-II (Lee y cols., 1989b; Palumbo y cols., 1992; Khabbaz y cols., 1992). Entre prostitutas alcanza el 6.7%, siendo mayor la incidencia cuando son ADVP (Khabbaz y cols., 1990).

Muchos países de **Centro y Suramérica** tienen evidencia de infección por HTLV-I. Recientemente se ha descrito que la infección por HTLV-II podría ser endémica en ciertas poblaciones indígenas del Nuevo Mundo. Estudios seroepidemiológicos realizados en un grupo de indios Guaymis de Panamá revelaron que un 5-8% tenían anticuerpos contra HTLV-II (Lairmore y cols., 1990; Reeves y cols., 1990). En tribus indígenas de Venezuela se ha detectado hasta un 13% de seropositividad debida a HTLV-II. En un pequeño estudio entre Indios Guajiros (Colombia) se detectó un 4.8% de seropositividad debida a HTLV-II (Dueñas-Barajas y cols., 1992). Hay un 0.4% de infección por HTLV-I en donantes de Brasil (Lee II y cols., 1989a). En Chile se ha encontrado infección por HTLV-I asociado a PET (Cartier y cols., 1988; Vasquez y cols., 1991). Entre indígenas de Colombia y

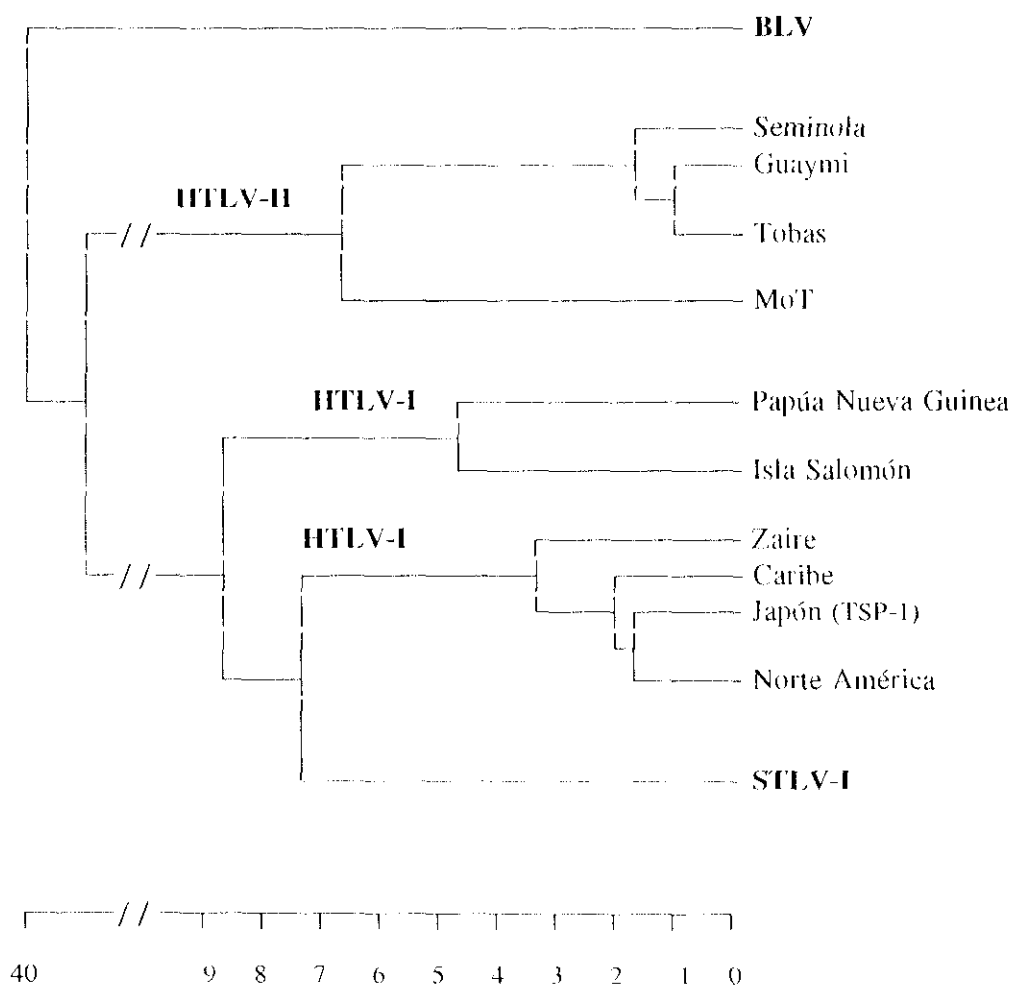
Paraguay se ha detectado el HTLV-I (Zamora y cols., 1990).

En Europa la prevalencia a HTLV-I es baja y casi limitada a ADVP e inmigrantes de áreas endémicas. A partir de julio de 1991 la detección de anticuerpos frente a HTLV-I/II es obligatoria en Francia entre donantes de sangre. La prevalencia de la infección por HTLV-I/II en población general en Francia es de 4.6/100.000. Entre población ADVP la prevalencia es muy variada, siendo de alrededor del 5% en Italia (De Rossi y cols., 1986; De Rossi y cols., 1991), 1.3% en Holanda (Van den Hoek y cols., 1988).

En España hay pocos estudios realizados entre población general o de riesgo para la detección de anticuerpos HTLV-I/II. Un estudio amplio entre prostitutas de distintos lugares de España reveló un 0.56% de seropositividad a HTLVs (Estébanez y cols., 1991). Entre ADVP de Guipuzcoa se detectó un 0.5% de infección por HTLV-II (Cilla y cols., 1993).

## 4. HETEROGENEIDAD GENETICA

Comparados con el VIH, los HTLVs muestran mucha menos variabilidad genética posiblemente debido a los relativamente bajos niveles de replicación vírica en los individuos infectados. Mientras que la diversidad genética y filogenia del HTLV-I han sido estudiadas en profundidad, muy poco se conoce todavía de la evolución del HTLV-II. Sin embargo, se acepta que el HTLV-II diverge del HTLV-I y del STLV-I hace muchos miles de años (Ehrlich y cols., 1992; Gessain y cols., 1993).



Esquema de las relaciones filogenéticas de los PTLVs

Figura 5

Estudios de secuenciación genética realizados en varias cepas de HTLV-I recogidas en distintos lugares del mundo revelan que las variaciones de un nucleótido en la misma posición podrían determinar el origen geográfico de los virus, pero no revelan ninguna información sobre las posibles patologías relacionadas (Daenke y cols., 1990; Kinoshita y cols., 1991; Shulz y cols., 1991; Ratner y cols., 1991; Komurian y cols., 1991).

La gran similitud entre las cepas de HTLV-I de África occidental con las del Caribe y América del Sur, indica que algunas han podido ser introducidas en el Nuevo Mundo a través de individuos infectados durante la época de esclavitud y que estas cepas sufren una muy baja variabilidad genética (Gray y cols., 1990; Gessain y cols., 1991b; Gessain y cols., 1992; Dekaban y cols., 1992).

Los aislados de Japón, Caribe y África donde el HTLV-I es endémico, la tasa mayor de divergencia entre diferentes aislados se estima en un 3.5%, pero generalmente es menor que ésta (Malik y cols., 1988; Gray y cols., 1990; Paine y cols., 1991). La mayoría de las diferencias de nucleótidos son mutaciones puntuales y no se correlacionan con la patogenicidad del virus (De BK y cols., 1991; Ehrlich y cols., 1992). Por el contrario, existe una divergencia de más del 8% entre el prototipo HTLV-IATK (Japón) y unas cepas recientemente aisladas de distintos lugares de Melanesia (Papúa Nueva Guinea e Islas Salomón)(Gessain y cols., 1991a) y Australia, que por otra parte presentan una gran divergencia entre ellas (las de Papúa Nueva Guinea varían un 4% de las de las Islas Salomón)(Babona y cols., 1988; Gessain y cols., 1991b; Yanagihara y cols., 1991; Gessain y cols., 1993).

Podría ser que estos nuevos aislados representen distintos subtipos moleculares del HTLV-I y podrían tener propiedades biológicas únicas. La figura 5 muestra un esquema de las relaciones filogenéticas PTLVs en relación con su homología de secuencia en gp21, gp46, LTR, pX y pol (Sherman y cols., 1992; Dube y cols., 1993).

Estudios basados en diferencias en los sitios de restricción de la región del gen



*env* del HTLV-II, que codifica para la proteína transmembrana gp21, han podido diferenciar dos tipos de aislados claramente diferenciados. Estos dos subtipos se denominan HTLV-IIA y HTLV-IIB y presentan una divergencia de al menos el 5% (Hall y cols., 1992). Se han realizado diversos estudios en el gen *pol* debido a que la transcriptasa inversa es esencial en el ciclo biológico de los retrovirus y sufre presiones selectivas que mantienen una conservación de secuencia a lo largo del tiempo. Mientras que existen múltiples recombinaciones en las secuencias *env* entre retrovirus poco relacionados, las secuencias *pol* reflejan mucho más fielmente sus relaciones filogenéticas (McClure y cols., 1988).

Hasta el momento sólo el aislado de HTLV-II MoT ha sido extensamente estudiado y secuenciado por completo su genoma (Shimotohno y cols., 1985). Los hasta ahora pocos aislados de HTLV-II de diversas regiones geográficas sólo han sido parcialmente secuenciados. Dube y cols. (1993) han analizado genéticamente varios aislados de HTLV-II procedentes de distintas zonas del continente americano, incluyendo aislados de Indios Seminolas en Florida, Guaymis en Panamá y Tobas en Argentina. Secuenciaron regiones de *pol*, LTR, *env* y *Px* que comparándolos con el prototipo MoT les permitió segregar el grupo de los HTLV-II en dos subtipos genéticamente diferenciados. Esta sugerencia es la misma que la que proponen Hall y cols. (1992) con sus aislados norteamericanos.

Por lo tanto, existen al menos dos subtipos de HTLV-II. Los aislados de los Indios Seminolas, Guaymis y Tobas y algunos aislados norteamericanos probablemente se puedan incluir en el subtipo B propuesto por Hall y cols., mientras que las variantes restantes de HTLV-II, incluido el prototipo MoT, podrían ser clasificados como subtipo A.

Los resultados de varios laboratorios sugieren que el grupo de los virus linfotrópicos de primates (PTLV), incluyendo el STLV-I, ha sufrido un relativo (comparado con VIH) lento y uniforme proceso evolutivo, con la divergencia del HTLV-II de un ancestro común a STLV-I y HTLV-I hace miles de años. Se ha

propuesto que el STLV-I y el HTLV-I se originaron en Asia, Africa o Australia y que por transmisión vertical y horizontal se extendieron hacia Melanesia, el Nuevo Mundo y Japón (Gessain y cols., 1991a; 1991b; 1993). Se piensa que el HTLV-I llegó al Hemisferio Oeste hace alrededor de 400 años por los comerciantes de esclavos europeos (Gallo, 1991).

Por el contrario, debido a que el HTLV-II se ha encontrado en población indígena americana, éste podría haber llegado al Hemisferio Oeste hace 10.000 ó 50.000 años con la llegada de inmigrantes procedentes de Siberia vía estrecho de Bering . Si esta hipótesis fuera cierta, uno podría esperar más diversidad entre diferentes aislados de HTLV-II que entre los aislados de HTLV-I.

Debido a que el grado de diversidad visto entre aislados de HTLV-II del Hemisferio Oeste es tan grande como el visto entre los aislados de HTLV-I del Nuevo Mundo, los HTLV-I de Melanesia (Saksena y cols., 1992), y el STLV-I, se puede concluir que la heterogeneidad entre los HTLV-II también representa muchos miles de años de evolución (por supuesto, suponiendo que las presiones selectivas sean similares para los dos tipos de virus). Si esto fuera cierto, no parece probable que el HTLV-II haya llegado al Nuevo Mundo por un simple grupo de europeos y africanos. Es más probable que el HTLV-II estuviera presente en la población indígena americana y/o que estuviera presente en diversas formas entre los inmigrantes al Nuevo Mundo. El hecho de que el HTLV-II sea endémico en muchos grupos diferentes de Indios americanos y que los indios Guaymis y Tobas se han mantenido aislados de los europeos y africanos desde hace 500 años, indica que al menos el subtipo B de los HTLV-II estaba presente en la población indígena pre-Colombina.

## 5. TERAPIA ANTIVIRICA

Hasta ahora existen pocos datos y estudios relacionados con la terapia y otras estrategias relacionadas con vacunas para la prevención o control de las infecciones por HTLV-I o HTLV-II. Esto posiblemente sea debido a que el riesgo de un individuo infectado por HTLV-I adquiera leucemia/linfoma de células T de adulto o síndromes degenerativos neurológicos como la mielopatía/paraparesia espástica tropical, es de 1-5% y 0.25%, respectivamente (Palker y cols., 1992). Además, hasta el momento no existen evidencias de una relación entre la infección por HTLV-II y una patología clara, excepto para un tipo de tricoleucemia.

Una aproximación a la terapia antivírica para HTLV-I/II podría estar dividida en, (a) agentes químicos que inhiben la replicación vírica y (b) agentes biológicos como interferones o toxinas (tabla IV).

El AZT (3'azido-2',3'-desoxitimidina o zidovudina) es un análogo de nucleósido que inhibe la replicación tanto del VIH como del HTLV-I bloqueando la elongación del ADN durante la síntesis de ADN vírico. Otros análogos de nucleósido que inhiben la replicación vírica son el ddC (didesoxicitidina) y el ddI (didesoxinosina) que han sido probados para el caso del VIH. El AZT y el ddC pueden inhibir la infectividad del HTLV-I para células T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (Matsushita y cols., 1987). Además, altas dosis de AZT podría inhibir la integración provírica en un modelo experimental de leucemia de células T de adulto asociada a HTLV-I en conejos (Isono y cols., 1990). Sin embargo, se ha visto que la administración de AZT a pacientes con mielopatía/paraparesia espástica tropical no produce mejoría clínica.

Los polisacáridos sulfatados (sulfato de dextrano, sulfato de lentinam) y los no sulfatados (E-P-LEM, extracto de *Lentinus edodes mycelia*) tienen actividad antivírica para VIH-1 y para HTLV-I *in vitro*. En este caso se vio que estos polisacáridos inhiben la infección vírica libre de células en VIH-1/2 y la formación de sincitios en

VIII-1/2 y HTLV-I (Tochikura y cols., 1989). Se piensa que estas sustancias interfieren en la interacción virus-receptor en los estadios tempranos de la inducción de la fusión.

La metilación provírica juega un importante papel en el control de la transcripción retrovímica humana (Bednarik y cols., 1987), aviar y murina y también está asociado la latencia en virus ADN de tumores. Se ha visto que los aislados províricos *in vivo* están hipometilados en las regiones de LTR y tax.

Paralelamente, las secuencias províricas en la línea celular MT-4, que es baja productora de virus, están fuertemente metiladas. El tratamiento de las células MT-4 con agente hipometilante 5-azacitidina resulta en un incremento de la expresión vírica *in vitro* (Saggiaro y cols., 1990). Este estudio sugiere que la metilación podría contribuir a la latencia y reducir la expresión vírica del HTLV-I.

La miristolación N-terminal de los precursores gag (Pr55<sup>gag</sup>) del HTLV-I y VIII-I se piensa que facilita el ensamblaje vírico por la asociación del N-terminal de la molécula precursora con la parte interna de la bicapa lipídica de las células infectadas antes de la proteólisis y de la formación de la cápsida. El N-miristoil glicinal dietilacetil, inhibidor de la proteína N-miristoil transferasa, previene la miristolación de la p19<sup>gag</sup> del HTLV-I (Shoji y cols., 1988). El bloqueo de la formación de la cápsida con agentes que impidan la miristolación podría ser importante en la prevención del ensamblaje vírico.

El inhibidor de la proteín-quinasa H7 bloquea específicamente la acumulación de ARNm gag-pol inhibiendo la fosforilación de rex (Adachi y cols., 1990). Los niveles de la proteína gag decrecen sin aparente cambio en los niveles de las proteínas de la envuelta. Por tanto, la fosforilación de rex se requiere para la propia regulación de la acumulación citoplasmática del ARNm no procesado.

La muerte selectiva de las líneas celulares transformadas por HTLV-I se puede

llevar a cabo con un n-pentil éter de damavaricina Fc (DVFc), un derivado de estreptovaricina C (Ito y cols., 1989). Este compuesto actúa incrementando el flujo de  $K^+$  sólo de las células infectadas por HTLV-I.

**TABLA IV**

**Terapia antivírica para HTLV**

<b>Terapia</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Química</b>	
AZT	Inhibe la replicación vírica bloqueando la elongación del ADN
Polisacáridos sulfatados y no sulfatados	Interfiere en la interacción virus-receptor
N-miristoil glicinal dietiacetil	Bloquea la miristolación de p19gag del HTLV-I
Inhibidor de la proteína II-7	Inhibe la fosforilación de rex
n-Pentil éter de damavaricina Fc	Elimina las líneas celulares transformadas por HTLV-I mediante la destrucción de las funciones de la membrana
Suramina	Inhibe la transcriptasa inversa
<b>Biológica</b>	
Interferones alfa, $\beta$ y gamma	Perturban el ensamblaje y la liberación de partículas infecciosas
Prostaglandina A	Suprimen la expansión clonal de células infectadas
Mutante rex	Inactivación transdominante de la expresión génica
ARN antisentido	Bloquea la traducción de p40tax y las secuencias señales en LTR necesarias para la replicación vírica ARN antisentido
Terapia dirigida hacia el receptor de la IL-2	Elimina las células IL-2R <sup>+</sup>

La **suramina**, un derivado de urea usado en el tratamiento de la tripanosomiasis y oncocercosis, puede inhibir la actividad transcriptasa inversa de varios retrovirus animales y humanos incluyendo VIH-1 y HTLV-I (Pesce y cols., 1987). Bajas concentraciones de suramina podrían reducir la infección por HTLV-I de linfocitos de cordón umbilical. Sin embargo, los niveles de ARNm vírico no se redujeron en los linfocitos de cordón infectados.

Los **interferones (IFN)** alfa,  $\beta$  y gamma son capaces de revertir la inmunosupresión inducida por HTLV-I en cultivos de sangre de cordón humana (D'Onofrio y cols., 1990). El IFN- $\beta$  produce un mejoramiento clínico transitorio en pacientes con LLTA (Oka y cols., 1990). Hay estudios en que la immortalización de PBLs humanos cocultivados con células MT-2 irradiadas letalmente se bloquea en presencia de IFN-alfa y - $\beta$  recombinantes, no obstante, el IFN-gamma recombinante no bloquea la immortalización ni a altas dosis (Oka y cols., 1992). Existen dos vías para las funciones antivíricas de los interferones; la vía de la proteína-quinasa dependiente de ARN de doble cadena y la vía de la sintetasa 2'-5'(An) (Pestka y cols., 1987). El mecanismo antivírico de estas vías en la traducción está bien establecido, pero es importante saber cómo, los interferones, ejercen su función en las fases tempranas de la infección por HTLV-I. Los posibles mecanismos podrían ser: 1) cambios en el número o distribución del receptor vírico, 2) cambios en la membrana plasmática que interrumpen la fusión del virus a la célula, 3) cambios en compartimentos subcelulares o en el ambiente citosólico que interfieren con la transcriptasa inversa o con la integración. Estas acciones de los IFNs indican varias posibles vías por las que pueden interrumpir directa o indirectamente en la replicación del HTLV-I (D'Onofrio y cols., 1992).

Las **prostaglandinas de tipo A (PGA)** tienen propiedades anti-proliferativas y antivíricas. Bloquean la proliferación de CBL infectados y suprime la proliferación de la línea MT-2 transformada por HTLV-I (D'Onofrio y cols., 1990).

Se han definido ciertos **mutantes rex** de HTLV-I que mantienen la capacidad

de localizarse en el núcleo celular pero no tienen la capacidad de mediar la expresión de la proteína env dependiente de rex. Unos plásmidos que llevaran genes mutantes rex transdominantes podrían inhibir competitivamente la función de la proteína rex de tipo salvaje, así como a rev del VIH-1, resultando en una inhibición dosis dependiente de la expresión de los genes estructurales víricas en células COS (Bohnelein y cols., 1991). Se ha sugerido que esta forma de represión génica vírica podría ser usada como un inmunógeno intracelular para bloquear la replicación vírica.

El uso de vectores retrovíricos para expresar **ARN antisentido** codificando secuencias 5'LTR esenciales para la expresión génica vírica y secuencias codificando la región pX correspondiente a la primera kilobase del gen tax de ADNc, llevan a reducir significativamente la replicación del HTLV-1 y la immortalización de linfocitos de cordón (Von Ruden y cols., 1989).

Un **anticuerpo monoclonal** (anti-Tac) dirigido contra la cadena alfa del receptor de la IL-2 se ha usado con éxito en el tratamiento de pacientes con LLTA inducido por HTLV-1. Este anticuerpo es capaz de bloquear la unión de la IL-2 a la cadena alfa de su receptor. El receptor de IL-2 es una diana útil para la terapia mediada por anticuerpos, porque no se expresa en las células en reposo y sí en las células transformadas. Otra posible terapia en pacientes con LLTA es la utilización de una inmunotoxina recombinante consistente en anti-Tac unida a una porción de la exotoxina de *Pseudomonas* (Waldmann y cols., 1988; Waldmann y cols., 1991).

# OBJETIVOS



1. Estudio de la prevalencia de la infección por HTLV en: 1) **población general** (donantes de sangre), en un país africano (Guinea Ecuatorial), y en dos países europeos (Portugal y España), diferenciando entre la infección por HTLV-I y HTLV-II, y 2) **población con prácticas de riesgo**: adictos a drogas por vía parenteral (ADVP).
2. Estudio de infección por HTLV en **patologías cutáneas** relacionadas con retrovirus: *Micosis fungoide*.
3. Estudio de las características de la **transmisión** del HTLV en una pareja de seropositivos a HTLV y en los miembros de su familia.
4. Análisis del **fenotipo** de los posibles virus aislados en las poblaciones estudiadas, que incluirá un estudio de infección a líneas celulares de diferente linaje y un ensayo de sensibilidad al antivírico zidovudina.
5. Análisis del **genotipo** de los posibles virus aislados, con el fin de relacionarlos con los hasta ahora descritos en otras áreas geográficas.
6. Estudio la **variabilidad genética**, tanto *in vivo* como *in vitro*, de los posibles aislados.

# MATERIALES Y METODOS

---

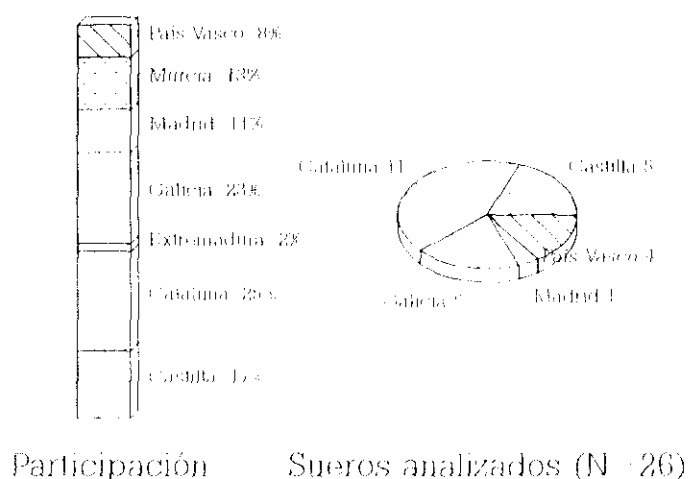
## **1. CASOS ESTUDIADOS**

**1. Treinta y seis sueros repetidamente positivos para HTLV en ELISA procedentes de Guinea Ecuatorial y 6 muestras de sangre completa del mismo estudio.** El estudio de prevalencia de HTLV-I/II se realizó en el Centro Hispano-Guineano de Enfermedades Tropicales (Hisp. Gral. de Malabo) y dirigido por la Cooperación Técnica Española en colaboración del Instituto de Salud Carlos III y el Ministerio de Sanidad de Guinea-Ecuatorial (Programa Nacional de Lucha Contra el SIDA) durante 1990. Se analizaron 1.129 sueros procedentes de donantes (aprox. 70%), embarazadas, pacientes con enfermedades de transmisión sexual (ETS) y tuberculosos. La mayoría proceden de Malabo y Bata, pero también de Ebebiying y Luba.

**2. Trece muestras de suero y sangre heparinizada para confirmar, procedentes de un estudio realizado entre Donantes de Sangre de Portugal.** El estudio se realizó a mediados de 1992. Se estudiaron aproximadamente 12.000 sueros.

**3. Veintiséis muestras para confirmar, procedentes de un estudio realizado en Bancos de Sangre de varias Autonomías españolas.** El estudio en los Bancos de Sangre se realizó entre los meses de septiembre y noviembre de 1992. La distribución de las Autonomías participantes y el número de muestras analizadas por ellos se muestra en la figura 1. Se analizaron 21.921 sueros.

Distribución geográfica y participación  
de los Bancos de Sangre (N=21.921)



**Figura 1**

**4. Ciento cuarenta y nueve muestras de sangre completa procedentes de población adicta a drogas por vía parenteral (ADVP) (Patriarca) en España.** Se recogieron datos sobre sexo, edad, tiempo de drogadicción y tipo de droga utilizada, así como viajes realizados en los últimos años y contactos sexuales con distintas parejas.

**5. Cinco muestras de sangre total pertenecientes a una misma familia.** El hombre es ADVP, la mujer es prostituta, no ADVP y seropositiva a HTLV. Se estudió el caso de una hija recién nacida y de dos hijos mayores.

**6. Dos muestras de sangre completa de individuos ADVP y VIH seropositivos.**

**7. Veintidós muestras de ADN procedentes de patologías cutáneas, *micosis fungoide*.**

## 2. LINEAS CELULARES

Se han utilizado dos tipos de líneas celulares primarias; linfocitos de sangre de cordón umbilical (CBLs) de donante seronegativo a HTLV-I/II y a VIH-1/2 y linfocitos de sangre periférica (PBLs) de donante seronegativo a HTLV-I/II y a VIH-1/2.

Las líneas celulares establecidas utilizadas han sido **MT-2** (línea linfoide CD4<sup>+</sup> [Miyoshi y cols.,1982] e infectadas por HTLV-I; cedidas por el Dr. D.D.Richman.), **C3/44 Mo** (línea linfoide infectada por HTLV-II), **MOLT-3** (linfoide), **HuT-78** (linfoma cutáneo de células T [Popovic y cols., 1984]), **CEM** (linfoide), **Raji** (linfoma de Burkitt), **U937-2** (linfoma histiocítico [Sundström y Nilsson, 1976]), **THP-1** (linfoma histiocítico) y **HL-60** (linfoide).

## 3. ESTUDIO SEROLOGICO

### 3.1 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Para la detección de anticuerpos específicos se empleó un ensayo inmunoenzimático (Abbott HTLV-I EIA; Abbott Laboratories). Una dilución 1/40 de los sueros se incubó con una esfera rodeada de antígeno procedente de un lisado vírico de HTLV-I de la línea celular HUT-102.B2 durante 1 h. a 40°C.

Después de un lavado y de otra incubación con anticuerpos IgG de cabra anti-humano conjugados con peroxidasa durante 30 min. a 40°C, se añade una solución con OPD (o-fenildiamina) y se incubó durante 30 min. a TA, parándose

la reacción con ácido sulfúrico 1 N. Los resultados se analizaron en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 492 nm. El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante.

### 3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la detección de anticuerpos anti-HTLV se utilizaron células MT-2 (infectadas por HTLV-1) y HuT-78 (no infectadas) mezcladas en una relación 1:3. Se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfatos (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4) y se sembraron 10<sup>4</sup> células en cada pocillo de un portaobjetos de inmunofluorescencia. Tras dejar secar al aire, se fijó en metanol:acetona (1:1; Merck) durante 10 min. a -20°C.

El criterio de interpretación utilizado es el siguiente:

---

<b>Positivo</b>	Fluorescencia en un 25% de las células como máximo. El porcentaje puede disminuir si el título del suero es bajo.
<b>Negativo</b>	No se observa fluorescencia
<b>Reacción inespecífica</b>	Porcentaje de fluorescencia superior al 25%

---

El inmunoensayo se realizó añadiendo a cada pocillo 10 µl de diferentes diluciones de los sueros a analizar, incubándose a 37°C durante 30 min. en cámara húmeda. El portaobjetos se lavó tres veces en PBS y se añadió por pocillo 10 µl de una dilución 1/20 de anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcada con

isotiocianato de fluoresceína (GAIH-FITC, Behring), incubándolo durante 30 min. a 37°C en cámara húmeda. El portaobjetos se lavó tres veces en PBS y se tiñó con un 1% de azul de Evans en PBS. El portaobjetos se montó con una solución de glicerina en PBS (90% v/v). La visualización de la fluorescencia se realizó mediante un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon).

### 3.3 Western blot (WB)

Se han utilizado dos tipos diferentes de equipos de WB (Diagnostic Biotechnology). El primero es un WB HTLV-I específico porque añade al lisado vírico total una proteína recombinante específica de HTLV-I (rgp46i) y una recombinante específica de HTLV-I y HTLV-II (rgp21) (WB-plus). El segundo incorpora una proteína recombinante específica de HTLV-I (MTA-1, env), una proteína recombinante específica de HTLV-II (K55, env), una proteína recombinante específica de HTLV-I y HTLV-II (rgp21) y un control de IgG (WB-v3).

Los criterios de interpretación adoptados por los fabricantes son los siguientes:

	<b>WB-plus</b>
<b>Positivo HTLV-I</b>	Reactividad en bandas gag (p19 ó p24), en bandas env (gp46 o rgp46i) y en la banda rgp 21
<b>Sospechoso HTLV-II</b>	Reactividad al menos en las bandas p24 y rgp21. Negatividad en la banda rgp46i
<b>Negativo</b>	No aparecen bandas
<b>Indeterminado</b>	Algunas bandas presentes

### WB-v3

---

Positivo HTLV-I	Reactividad en bandas gag (p19 ó p24), env (gp46 ó MTA-1) y en la banda rgp21
Positivo HTLV-II	Reactividad en gag (p24) y env (K55) y en la banda rgp21
Negativo HTLV-I/II	No aparecen bandas
Indeterminado	Algunas bandas presentes

---

Las tiras de nitrocelulosa se incubaron durante toda la noche con una dilución 1/100 de los sueros. Después de lavarlas y de una segunda incubación con anticuerpos IgG de cabra anti-humano conjugados con fosfatasa alcalina, las tiras se expusieron a BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) y NBT (nitroblue tetrazolium) para su revelado. El método se realizó según las indicaciones del fabricante.

## 4. CULTIVOS CELULARES

### 4.1 Subcultivos celulares

Las líneas celulares se crecieron en medio RPMI 1640 (Flow) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF; Gibco), 2 mM de L-glutamina (Flow), 100  $\mu$ g/ml de penicilina (Sigma), 100  $\mu$ g/ml de estreptomina (Sigma) y 0.5% de fillosina (Flow). Se cultivaron a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad. Fueron mantenidas a una concentración de 0.5-1x10<sup>6</sup> céls/ml, renovando con medio fresco cada 2-3 días. La viabilidad de los cultivos se determinó por tinción con azul tripano.



Las células se guardaron congeladas en nitrógeno líquido a una concentración de  $5 \times 10^6$  céls/ml en medio completo suplementado con un 20% de SBF y un 10% de DMSO (Merck).

#### **4.2 Purificación de los linfocitos**

La sangre periférica o de cordón umbilical completa heparinizada se centrifugó en un gradiente de densidad (Lymphoprep; Nycomed, Pharma) a 1.400 rpm durante 15 min. En la interfase se localizan los linfocitos mientras los eritrocitos sedimentan. Una vez recogidos los linfocitos, se lavaron en PBS dos veces y se cultivaron en medio completo suplementado con un 10% de SBF y 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de fitohemaglutinina-P (PHA-P; Difco) durante 3 días para su activación.

#### **4.3 Crecimiento del virus**

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) de casos seropositivos o indeterminados se cocultivaron con PBLs o CBLs de donante preestimulados en una relación 1:4. El cultivo se mantuvo hasta la aparición de transformación celular y detección de antígeno p24 soluble.

El crecimiento del virus en otras líneas celulares se realizó por cocultivo, con un tratamiento previo de los PBLs infectados con 100  $\mu\text{g/ml}$  de mitomicina-C (MMC; Sigma) durante 30 min. para impedir la división celular de éstas.

## 5. DETECCION DEL VIRUS

### 5.1 Inmunofluorescencia (IFI)

Para ver la expresión de antígeno específico en la superficie celular se realizó una IFI de la misma manera que se ha descrito anteriormente, con algunas modificaciones. Las células a estudiar son las sembradas y se utilizaron sueros seropositivos a HTLV-I/II o anticuerpos monoclonales de ratón anti-p24, -19 ó -gp46 de HTLV-I/II (Chemicon y Biosoft) .

En el caso de utilizar anticuerpos monoclonales, se utilizó posteriormente un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (GAM-FITC; Behring).

### 5.2 Amplificación del material genético (PCR)

#### Extracción del ADN

El ADN celular ( $10^6$  céls/100  $\mu$ l) fue extraído tratando las células con Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M, proteinasa K (Merk) 200  $\mu$ g/ml y 0.5% de SDS (Boehringer Mannheim) durante 60 min a 65°C y posteriormente toda la noche a 37°C. Después, se añadió un volumen de Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, NaCl 0.65 mM y se realizaron tres extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol a -70°C durante 30 min. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. a 4°C y se resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). La medida de la concentración de ADN se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

## Reacción de amplificación de ADN

Aproximadamente se utilizó 1  $\mu$ g de ADN celular por cada reacción de amplificación que contiene KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 1-1.5 mM, 1.75 u de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer Cetus), 125  $\mu$ M de cada uno de los dNTP (Pharmacia), 100  $\mu$ g/ml de gelatina y 150 ng de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (Biosynthesis) en un volumen final de 50  $\mu$ l.

Los oligonucleótidos iniciadores empleados, excepto SK111, SK110, PC04 y GH20 (Perkin-Elmer), fueron seleccionados usando la secuencia completa de ADN de HTLV-I (Seiki y cols., 1983) y de HTLV-II (Shimotohno y cols., 1985). Fueron sintetizados por el servicio de Microscopía Electrónica del CNMVIS (Instituto de Salud Carlos III) y por Biosynthesis y se detallan en la tabla I.

Utilizando un termociclador de ADN (Perkin-Elmer Cetus) la mezcla fue previamente desnaturalizada 5 min. a 94°C, a continuación se realizaron 35 ciclos de 20 seg. a 94°C, 45 seg. a 50-55°C y 30 seg. a 72°C y una extensión final de 5 min. a 72°C. El ADN amplificado se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 10 mM).

Los productos de PCR se analizaron mezclando 5  $\mu$ l de cada producto de reacción con 5  $\mu$ l de solución de carga y realizando una electroforésis en gel de poliacrilamida al 6% (PAGE). Después de la electroforésis, los productos se visualizaron por tinción del gel con bromuro de etidio (Stratagene). El marcador de peso molecular utilizado fue  $\beta$ X174 Hinf I (Stratagene).

**TABLA I**  
**Oligonucleótidos empleados para la amplificación de ADN**

Nombre	Secuencia (5'-3')	Virus	Tamaño frag.(pb)	Gen	Posición
12P1	GCCTTCATGTATGGGTAGACACCTT	HTLV-III		pol	4525-4549 (HTLV-I)
2	GTGGTGGATTTGCCATCGGGTTTT	HTLV-III	398	pol	4920-4897 (HTLV-II)
1P1	AGCCATCTCAGCTACCCAAAAGAGA	HTLV-I		pol	4556-4580
2P3	CGCATCAAGCATCTACCCA	HTLV-II		pol	4711-4730
12P5	TGGTTGATTGTCCATAGGGCT	HTLV-III	318 (HTLV-I) 161 (HTLV-II)	pol	4873-4853 (HTLV-II)
1 sonda	CCAJACAACCCACCAGCTCAG	HTLV-I/II		pol	4735-4756 (HTLV-II)
12E3	GACCACCAACACCATGGG	HTLV-I/II		env	5167-5184 (HTLV-II)
12E4	GCTAGGGCGGAGACAAGCC	HTLV I/II	944	env	6141-6123 (HTLV-II)
1E8	TCAAGAAGTTTACACCTCAAT	HTLV-I		env	5607-5628
1E5	GAITTCCAIGGTATAGAGGGCTC	HTLV I	198	env	5804-5782
1E7 sonda	TCGGTATTAAGGAACCAGATGGGGT	HTLV-I		env	5717-5693
8	CAGCCAAGTGTCCCTTCGA	HTLV-II		env	5602-5620
9	ATTTGAGTATTTGGTCCG	HTLV II	203	env	5804-5787
10 sonda	ATCCTTTATGGTTCATCACCTCAGA	HTLV-II		env	5679-5703
gag1	GTCAGGCCTGGACCCCAAAGAC	HTLV-I		gag	1797-1819
gag2	GAGGGCATCCTCCTCTGGCTCTG	HTLV-I	236	gag	2032-2010
gag4	ACCAAAGTGTAGTTGTCCAGCCT	HTLV-I		gag	1823-1846
gag5	TGGGATAGTGGGCIITAGGCGGG	HTLV-I	183	gag	2005-1983
2x1	AGGGGGAGGCACACCAGATGT	HTLV-II		tax/rex	7106-7126
2x3	GGGGTGTGCTTTCGCATTGAT	HTLV-II	445	tax/rex	7550-7530
2x6	CATCGACATGCCCTCCTGGC	HTLV-II		tax/rex	7330-7349
2x4	CAGGTGGAACCTTGGGGGAGAC	HTLV-II	189	tax/rex	7519-7498
PC04	CAACTTCATCCACGTTTACC			β-Globina	54-73
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC		268	β-Globina	195-176

## **Southern blot, marcaje de sondas e hibridación**

El ADN amplificado fue fraccionado por electroforesis en gel de agarosa. Después de una desnaturalización alcalina (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) y una neutralización (Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M), el ADN fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon.

Las sondas específicas (100 ng) fueron marcadas utilizando gamma-ATP-<sup>32</sup>P y la enzima polinucleótido kinasa de T4 en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM y espermidina 0.1 mM durante 45 min. a 37°C. La sonda se purificó mediante una columna de Sephadex G-25.

Las membranas fueron hibridadas con las sondas específicas marcadas en solución de citrato sódico (SSC) 6x (1x: NaCl 150 mM; citrato sódico 15 mM), denhart 5x (100x: ficoll 2%, polivinilpirrolidona 2%, BSA 2%), SDS 0.2% y 50 µg/ml de ADN de esperma de salmón durante toda la noche a 45°C. Las membranas fueron lavadas con SSC 2x y SDS 0.1% durante 20 min. a 45°C y expuestas a una película de rayos-X (Kodak) con pantallas amplificadoras (Dupont).

Para la hibridación líquida, 10 µl de cada reacción de PCR fue mezclada con 100 ng de sonda específica marcada con gamma-ATP-<sup>32</sup>P. Después de una desnaturalización a 94°C durante 10 min., la mezcla se incubó a 56°C durante 30 min. Se recogieron 5 µl y se mezclaron con 5 µl de solución de carga y se sometió a una PAGE al 6%. El gel se secó en bomba de vacío y se expuso a una película de rayos-X durante 8-16 h.

### **5.3 Detección de antígeno p24 soluble en sobrenadante de cultivos**

El antígeno p24 de HTLV-I/II se detectó en el sobrenadante de los cultivos mediante un ensayo inmunoenzimático (Coulter HTLV-I,II Ag Assay). El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante.

Tras una incubación del sobrenadante en un pocillo cubierto por un anticuerpo monoclonal de ratón anti-p24 de HTLV-I/II de 2 h a 37°C, se lavó y se añadieron anticuerpos anti-HTLV-I/II humanos biotinilados. Tras una incubación de 1 h a 37°C, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (SA-HRPO), incubándose durante 30 min. a 37°C. El desarrollo del color se realizó añadiendo peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia del cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). El análisis se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

#### **5.4 Secuenciación**

La secuenciación del ADN amplificado por PCR se realizó mediante una PCR asimétrica en cuatro reacciones paralelas (14 µl de volumen final/reacción) conteniendo KCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 2 u de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer Cetus), 12.5 µM de cada dNTP (Pharmacia), 0.5 µg de un único oligonucleótido iniciador, 10 µCi de alfa-dCTP-<sup>32</sup>P (Amersham), 1 µl del ADN amplificado previamente y un ddNTP (Pharmacia) por reacción en las concentraciones siguientes: ddGTP 160 µM, ddATP y ddTTP 500 µM y ddCTP 800 µM (Ruano y Kidd, 1991) . Los ciclos fueron los mismos a los empleados para la realización de la PCR.

La secuencia se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y urea 7 M (Boehringer Mannheim) a 65 w durante 2-6 h. El gel secado en bomba de vacío se expuso a una película de rayos-X (Kodak) a TA durante toda la noche.

## 6. SENSIBILIDAD A ANTIVIRICOS

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos (Costar), poniendo en cada pocillo 75.000 céls. en un total de 200  $\mu$ l. El ensayo se realiza por duplicado sin y con 5 y 10 mM del antivirico zidovudina (ZDV; Wellcome). Diariamente, durante 13 días, se retiran 175  $\mu$ l de medio de cada pocillo, conservándose a una temperatura de -70°C hasta su uso, y se añade medio nuevo sin y con antivirico. Cada dos días se recogen 10  $\mu$ l de medio resuspendido para valorar la viabilidad de los cultivos. Los sobrenadantes recogidos los días 4, 7 y 13 se estudian para la detección de antígeno p24 soluble.

# RESULTADOS I

---



# **Detección simultánea de los retrovirus HTLV de tipo I y tipo II por PCR-simple y diferenciación por PCR-anidada**

## **1. Especificidad de los sistemas pol y env**

Estos dos sistemas detectan simultáneamente los virus HTLV-I y HTLV-II en una PCR-simple y discriminan entre ambas infecciones mediante una segunda PCR o PCR-anidada. La pareja de oligonucleótidos empleada en el sistema pol para la PCR-simple es 12P1/SK111. Esta pareja amplifica una región del gen pol de ambos virus, HTLV-I y HTLV-II, simultáneamente. La PCR-anidada, utilizando los oligonucleótidos 2P3/1P1/12P5, y en una sola reacción, diferenciará el genoma del HTLV-I del genoma del HTLV-II (ver secuencia de oligonucleótidos en Materiales y Métodos).

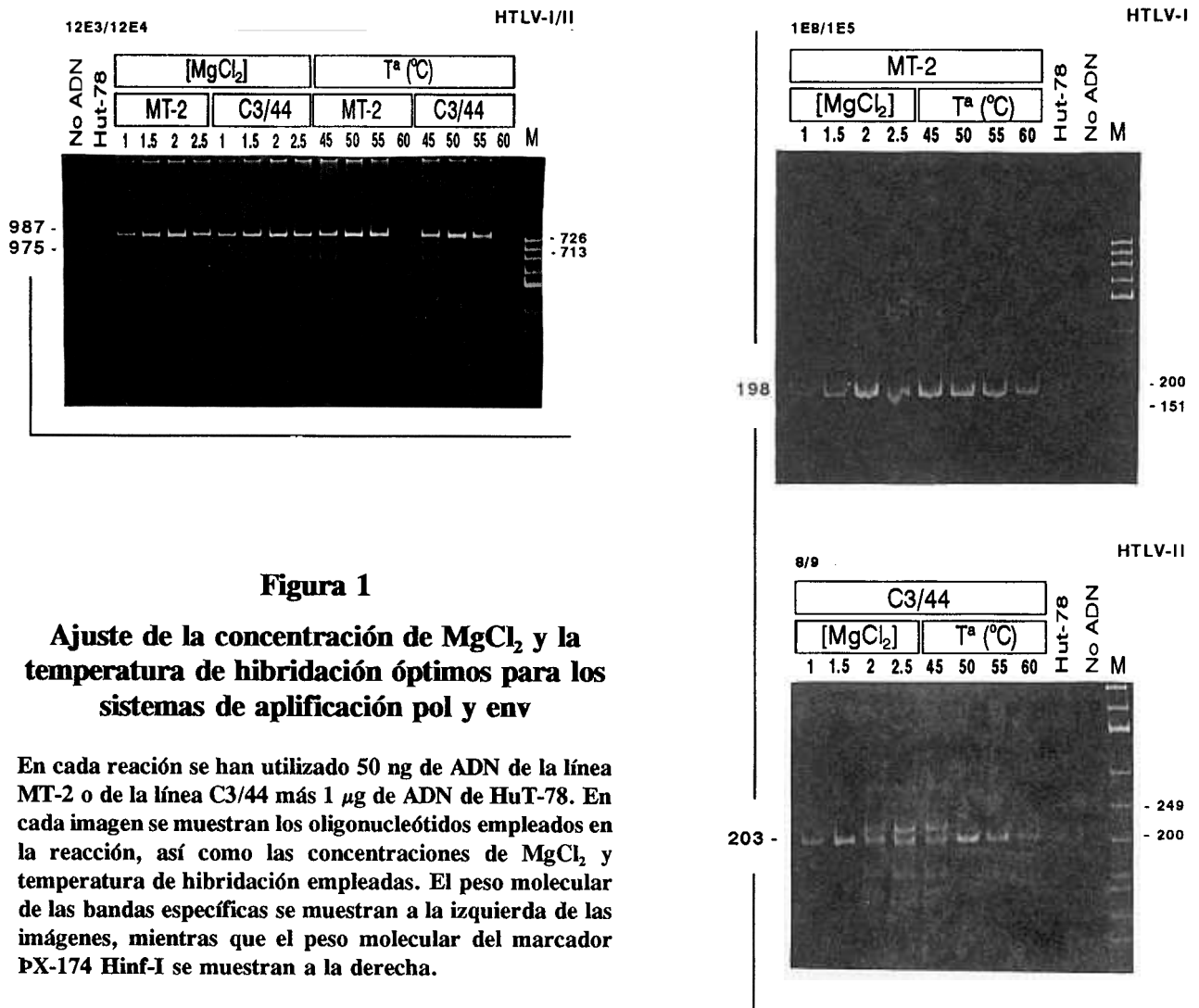
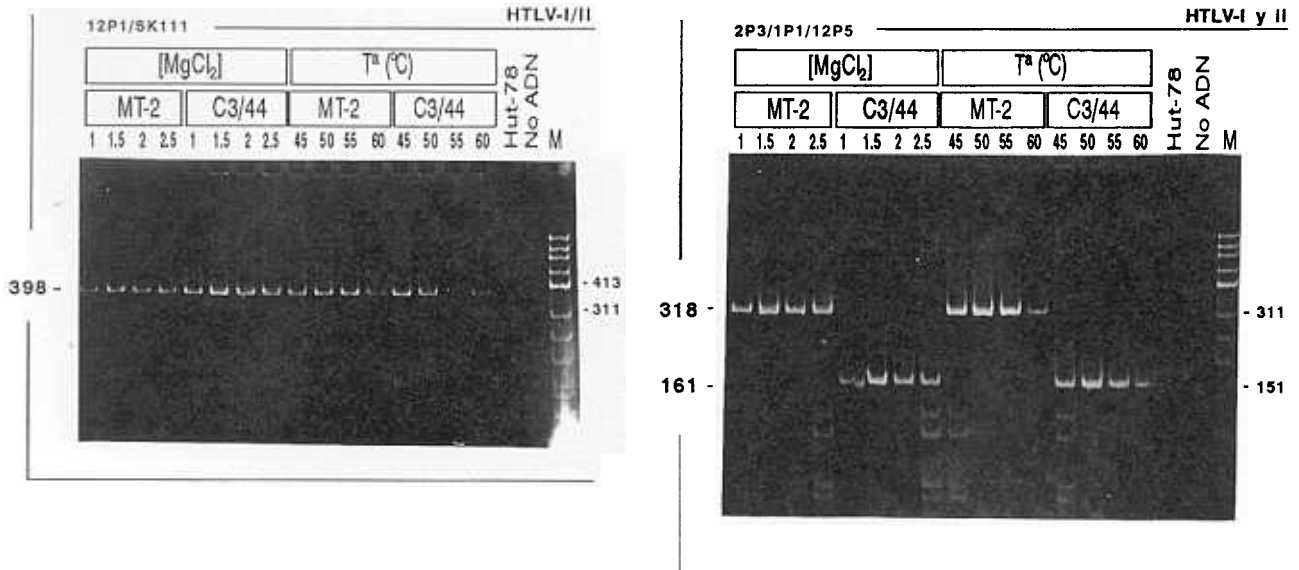
En el sistema env se emplea la pareja 12E3/12E4 para la realización de la PCR-simple, que también amplifica para ambos virus simultáneamente. La posterior tipificación de los virus se realiza mediante dos PCR-anidadas por separado. Una utiliza oligonucleótidos específicos para amplificar solamente genoma del HTLV-I, pareja 1E8/1E5, y la otra utiliza oligonucleótidos específicos para amplificar solamente genoma del HTLV-II, pareja 8/9. Los resultados del ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub> para obtener la máxima especificidad en las reacciones de amplificación, se presentan en la figura 1. Como ADN específicos víricos hemos empleado el ADN de las líneas celulares MT-2 (infectada por HTLV-I) y C3/44 Mo (infectada por HTLV-II). Como control negativo se utilizó el ADN de la línea celular Hut-78 (no infectada), así como una reacción de PCR sin añadir ADN con el fin de poder detectar posibles contaminaciones debidas a la manipulación de las muestras. Primero se realizó el ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub> con una temperatura de hibridación fijada a 50°C para cada una de las

parejas de oligonucleótidos utilizados. Las concentraciones utilizadas fueron de 1, 1.5, 2 y 2.5 mM. Para cada concentración se realizaron cuatro reacciones en paralelo, la primera con 50 ng de ADN de la línea MT-2 más 1  $\mu$ g de ADN de la línea Hut-78. La segunda con 50 ng de ADN de la línea C3/44 Mo más 1  $\mu$ g de ADN de la línea Hut-78. La tercera con 1  $\mu$ g de ADN de la línea Hut-78 y la cuarta sin ADN. En la figura 1 sólo se muestra el resultado de la tercera y cuarta reacción realizada a una concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$  y 50°C de temperatura de hibridación, los resultados en las otras concentraciones fueron similares a los obtenidos para la concentración mostrada en la figura 1.

Para el sistema pol, parejas 12P1/SK111, 2P3/1P1/12P5 y 8/9, la mejor amplificación se logró con una concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ . Para 12E3/12E4 y 1E8/1E5 la concentración óptima fue de 2 mM de  $MgCl_2$ . Fijando la concentración de  $MgCl_2$  óptima para cada pareja, se realizó el ajuste de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. Las temperaturas a ensayar fueron 45, 50, 55 y 60°C (Figura 1). En general, se observa una disminución en la amplificación a medida que aumenta la temperatura. Por otro lado, a bajas temperaturas aparecen algunas bandas inespecíficas. Por tanto, consideramos la temperatura de 50°C como la de mayor especificidad para las cinco parejas de oligonucleótidos. Cada ensayo se ha realizado al menos dos veces y por duplicado. La tabla I recoge la concentración y temperatura elegidas para cada pareja de oligonucleótidos.

**TABLA I**  
**Concentración de  $MgCl_2$  y temperatura de hibridación**  
**óptimos para cada pareja de oligonucleótidos**

	[ $MgCl_2$ ] (mM)	T <sup>a</sup> (°C)
12P1/SK111	1.5	50
2P3/1P1/12P5	1.5	50
12E3/12E4	2	50
1E8/1E5	2	50
8/9	1.5	50



**Figura 1**

**Ajuste de la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de hibridación óptimos para los sistemas de amplificación pol y env**

En cada reacción se han utilizado 50 ng de ADN de la línea MT-2 o de la línea C3/44 más 1 µg de ADN de HuT-78. En cada imagen se muestran los oligonucleótidos empleados en la reacción, así como las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y temperatura de hibridación empleadas. El peso molecular de las bandas específicas se muestran a la izquierda de las imágenes, mientras que el peso molecular del marcador pX-174 Hinf-I se muestran a la derecha.

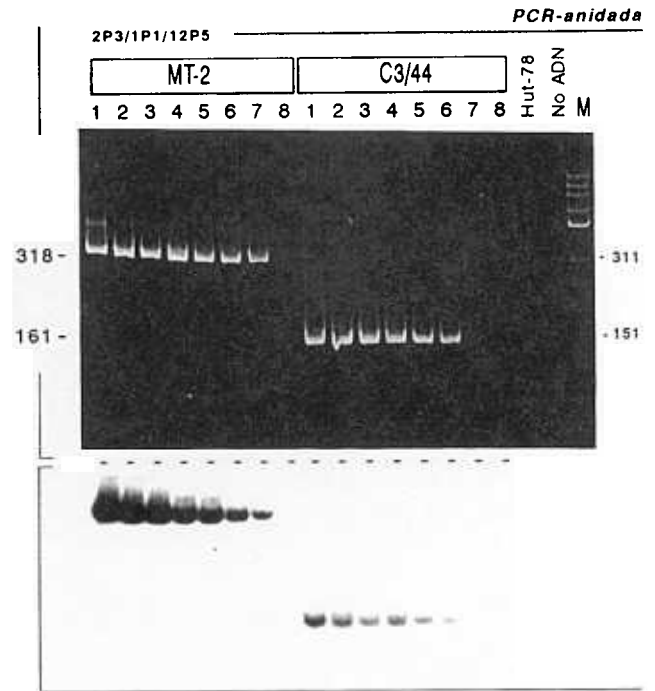
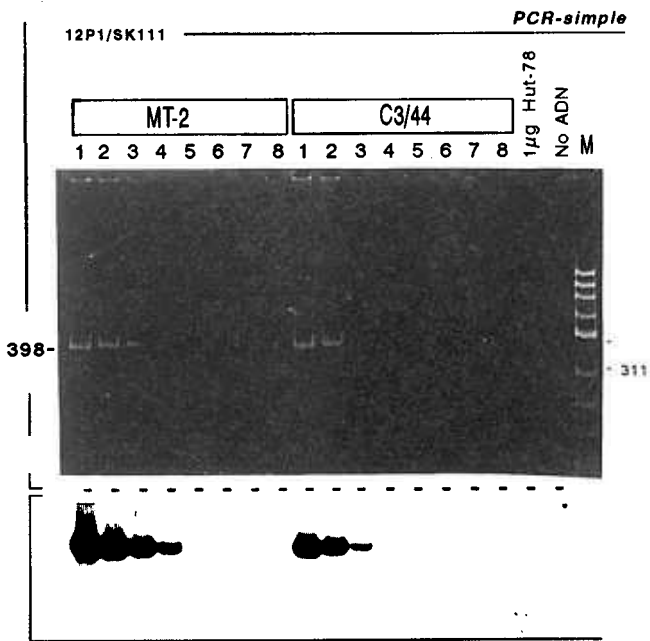
## **2. Sensibilidad de los sistemas pol y env**

Después de fijar las variables anteriores, realizamos un ensayo de sensibilidad para los dos tipos de sistemas, con el fin de determinar la cantidad mínima de ADN específico detectable mediante este sistema de PCR. Para cada sistema se realizan dos reacciones de PCR, la segunda empleando oligonucleótidos localizados internamente en relación a los empleados en la primera reacción de PCR (PCR-anidada). Las cantidades de ADN de las líneas celulares infectadas (MT-2 y C3/44) utilizadas en los ensayos han sido: 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 50 pg, 25 pg, 5 pg, 1.5 pg y 1 pg. Los resultados de sensibilidad de los dos sistemas y referidos a la PCR-simple, se muestran en la figura 2. Los resultados se obtienen por visualización directa del gel teñido con EtBr y por hibridación líquida, utilizando sondas específicas marcadas radiactivamente.

En el sistema pol, empleando las pareja 12P1/SK111, podemos detectar una banda específica de 398 pb con 0.1 ng de ADN de MT-2 y con 1 ng de ADN de C3/44 en el gel teñido. Después de la hibridación con la sonda 1, detectamos la banda específica con 50 pg de ADN de MT-2 y con 0.1 ng de ADN de C3/44. No se detecta ninguna banda en los controles utilizados. En la PCR-anidada, oligonucleótidos 2P3/1P1/12P5, podemos observar una banda específica de 318 pb con 1.5 pg de ADN de MT-2 y una banda de 161 pb con 5 pg de ADN de C3/44. La hibridación con la sonda 1 no muestra mayor sensibilidad que la observada en el gel.

En el sistema env, empleando la pareja 12E3/12E4, detectamos una banda específica de 987 pb con 1 ng de ADN de MT-2 y una banda de 975 pb con 0.1 ng de ADN de C3/44. La hibridación con las sondas 1E7 y 10, nos muestra una banda de 987 pb con 0.1 ng de ADN de MT-2 y una banda de 975 pb con 0.1 ng de ADN de C3/44. En la PCR-anidada utilizando los oligonucleótidos 1E8/1E5, específicos para HTLV-I, detectamos una banda de 198 pb con 5 pg de ADN de MT-2 en gel y con 1.5 pg después de la hibridación con la sonda 1E7. No se

pol



env

Sensibilidad

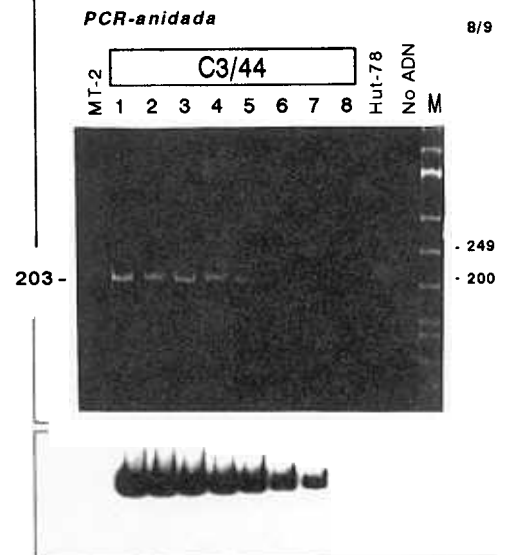
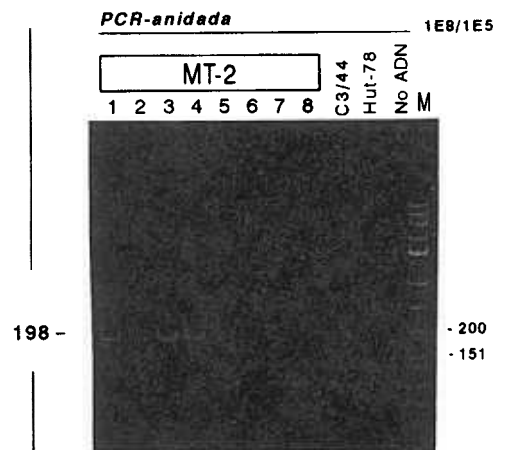
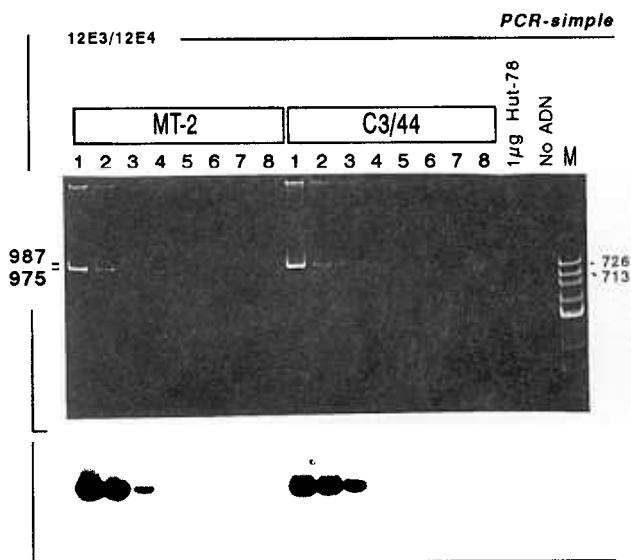


Figura 2

Sensibilidad de los sistemas pol y env

En cada reacción se ha empleado 1 μg de ADN de HuT-78 más: 1, 10 ng; 2, 1 ng; 3, 0.1 ng; 4, 50 pg; 5, 25 pg; 6, 5 pg; 7, 1.5 pg; 8, 1 pg del ADN de la línea celular que se especifica en cada imagen. La fotografía inferior de cada imagen corresponde a la hibridación con sondas marcadas radiactivamente. El peso molecular de las bandas específicas se señalan a la izquierda y las bandas del marcador  $\Phi$ X-174 Hinf-I, a la derecha.

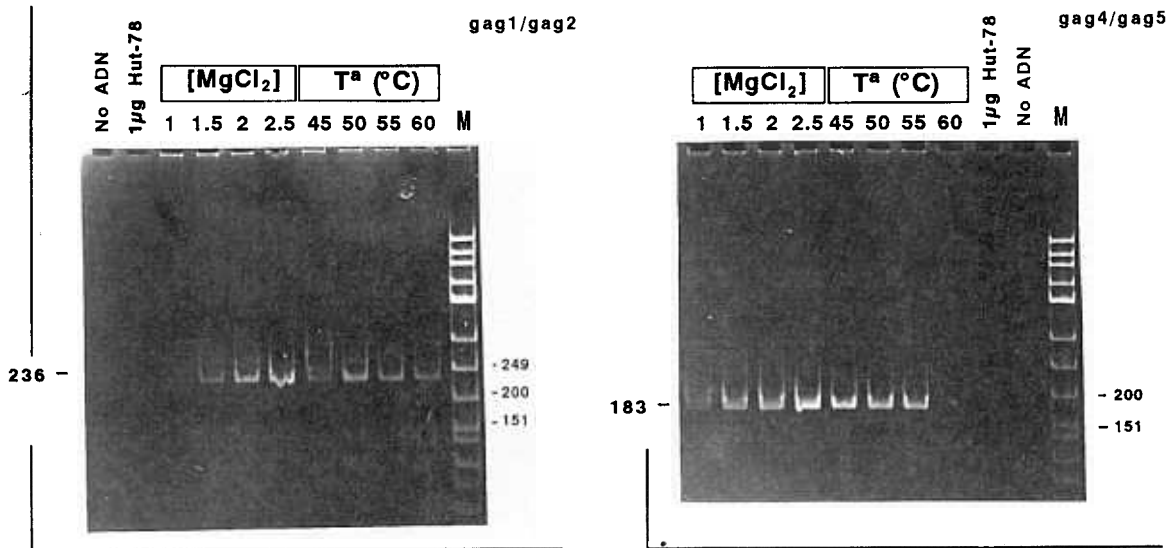
observan bandas específicas utilizando la reacción de 10 ng de ADN de C3/44 de la PCR-simple. La PCR-anidada con los oligonucleótidos 8/9, específicos para HTLV-II, muestra una banda específica de 203 pb con 5 pg de ADN de C3/44 y con 1.5 pg después de la hibridación con la sonda 10. Asimismo, no se observa banda específica utilizando la reacción de 10 ng de ADN de MT-2 utilizada en la PCR-simple.

### **3. Especificidad y sensibilidad de los sistemas gag y tax/rex**

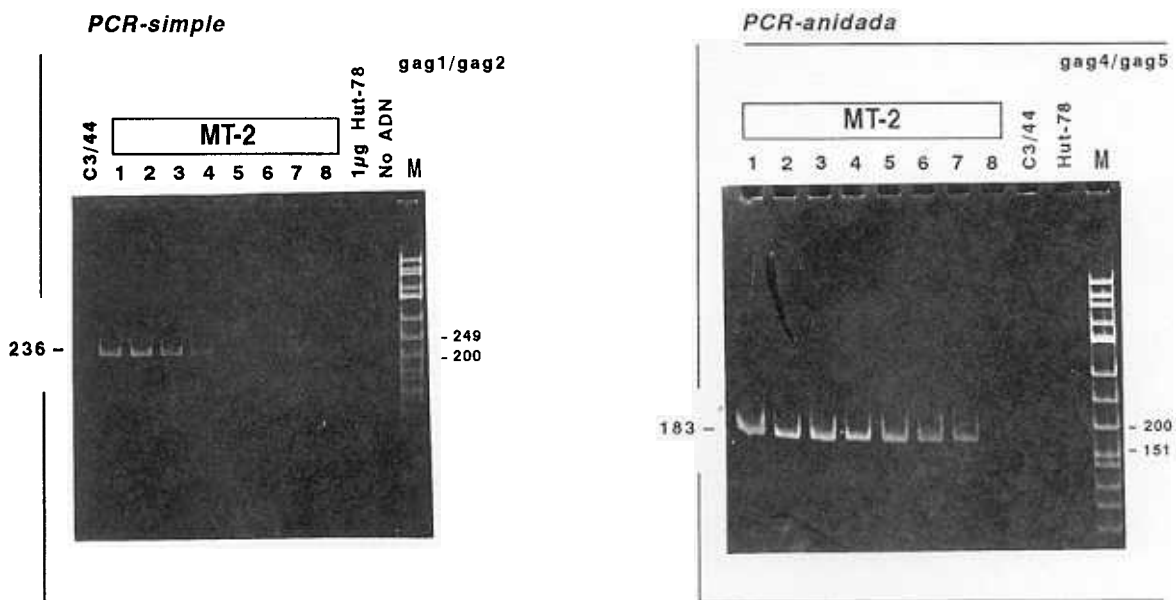
Utilizamos un sistema específico para la amplificación del gen gag del HTLV-I, oligonucleótidos gag1/gag2 y gag4/gag5, y del gen tax/rex del HTLV-II, oligonucleótidos 2x1/2x3 y 2x6/2x4. Los ensayos realizados para obtener la máxima especificidad fueron realizados de la misma forma que para los sistemas pol y env.

La figura 3 muestra los resultados en el sistema gag, específico de HTLV-I. La concentración de MgCl<sub>2</sub> óptimo para las parejas gag1/gag2 y gag4/gag5 es de 2.5 mM. La temperatura de hibridación que produce mayor amplificación sin la aparición de bandas inespecíficas es de 50°C para la pareja gag1/gag2 y de 45-50°C para gag4/gag5. El resultado más óptimo de concentración de MgCl<sub>2</sub> y de temperatura de hibridación para cada sistema se esquematizan en la tabla II.

La PCR-simple, utilizando gag1/gag2, detecta una banda de 236 pb con 50 pg de ADN de MT-2, mientras que la PCR-anidada, utilizando gag4/gag5, detecta una banda específica de 183 pb con 5 pg de ADN de MT-2. En ningún caso se detecta amplificación utilizando ADN de C3/44 ó HuT-78.



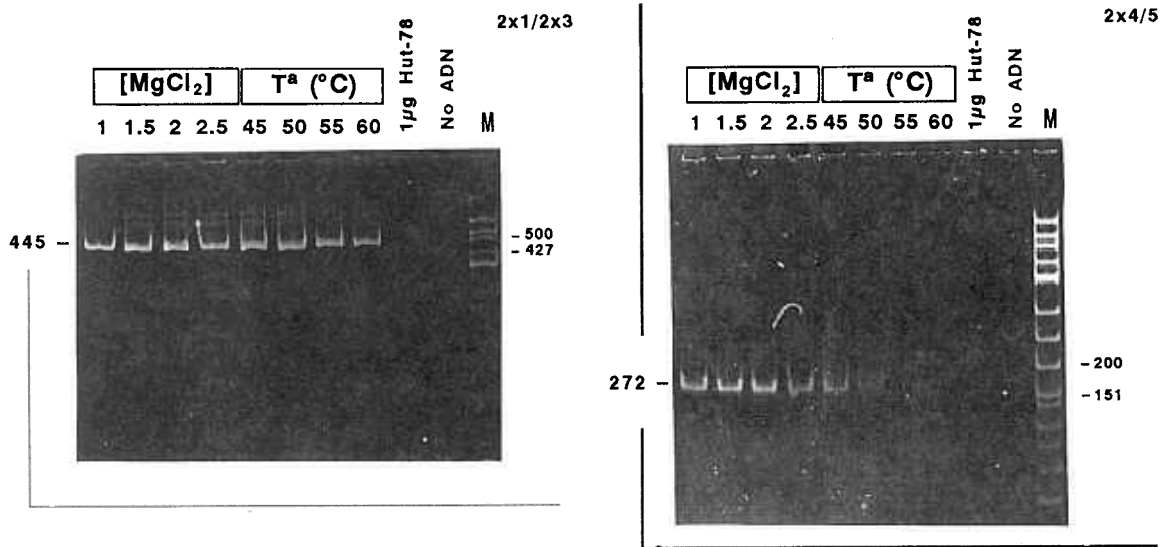
*Sensibilidad*



**Figura 3**

**Especificidad y sensibilidad del sistema *gag*, específico para HTLV-I**

Las imágenes de la izquierda representan las distintas concentraciones de  $MgCl_2$  y temperaturas de hibridación en el ajuste de la especificidad. Las imágenes de la derecha representan el grado de sensibilidad de la PCR-simple y de la PCR-anidada. En este ensayo se empleó  $1 \mu g$  de HuT-78 más: 1, 10 ng; 2, 1 ng; 3, 0.1 ng; 4, 50 pg; 5, 25 pg; 6, 5 pg; 7, 1.5 pg; 8, 1 pg de ADN de MT-2. Como controles se empleó ADN de C3/44 y HuT-78. El peso molecular de las bandas específicas se señalan a la izquierda y las bandas del marcador  $\Phi X$ -174 Hif-I a la derecha.



Sensibilidad

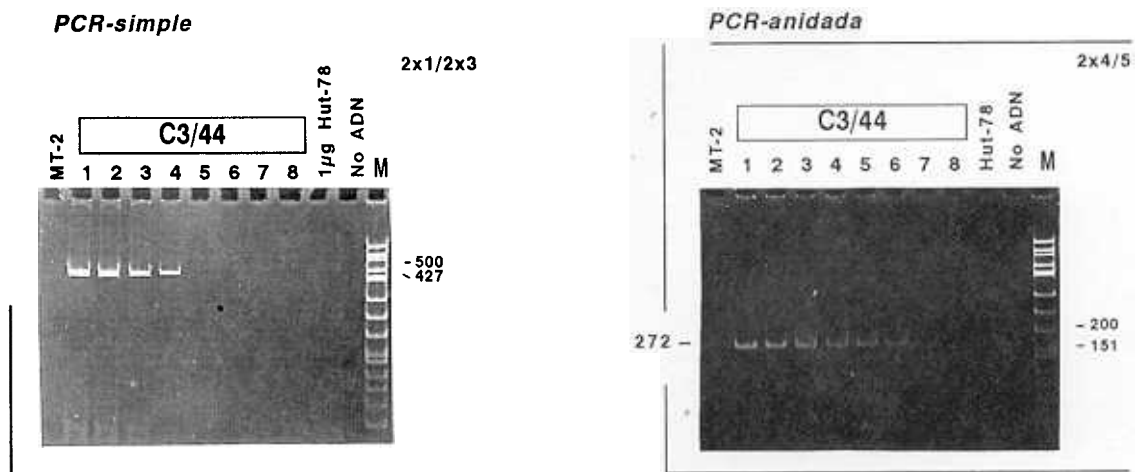


Figura 4

Especificidad y sensibilidad del sistema tax/rex, específico para HTLV-II

Las imágenes de la izquierda representan las distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y temperaturas de hibridación en el ajuste de la especificidad. Las imágenes de la derecha representan el grado de sensibilidad de la PCR-simple y de la PCR-anidada. En este ensayo se empleó 1 µg de HuT-78 más: 1, 10 ng; 2, 1 ng; 3, 0.1 ng; 4, 50 pg; 5, 25 pg; 6, 5 pg; 7, 1.5 pg; 8, 1 pg de ADN de C3/44. Como controles se empleó ADN de MT-2 y HuT-78. El peso molecular de las bandas específicas se señalan a la izquierda y las bandas del marcador  $\Phi$ X-174 Hif-I a la derecha.



**Tabla II**  
**Concentración de MgCl<sub>2</sub> y temperatura de hibridación  
 óptimos para cada pareja de oligonucleótidos**

	[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	T <sup>a</sup> (°C)
gag1/gag2	2.5	50
gag4/gag4	2.5	45-50
2x1/2x3	1	55
2x6/2x4	2	45

La figura 4 muestra los resultados del sistema tax/rex, específico de HTLV-II. La concentración óptima se ha fijado en 1 mM para 2x1/2x3 y 2 mM para 2x6/2x4. La temperatura de hibridación que produce mayor amplificación es 55°C para 2x1/2x3 y 45°C para 2x6/2x4.

La PCR-simple, utilizando 2x1/2x3, detecta una banda de 445 pb con 50 pg de ADN de C3/44, mientras que la PCR-anidada, utilizando 2x6/2x4, detecta una banda específica de 189 pb con 5 pg de ADN de C3/44. En ningún caso se detectó amplificación utilizando ADN de MT-2 ó HuT-78.

# DISCUSSION I

---

## **Detección simultánea de los retrovirus HTLV de tipo I y tipo II por PCR-simple y discriminación por PCR-anidada**

El HTLV-I y el HTLV-II presentan un 65% de homología de secuencia en nucleótidos y un 70% de secuencia de aminoácidos, lo que hace que existan reactividades cruzadas en algunos ensayos serológicos. Debido a esto, hasta que aparecieron los primeros ensayos serológicos incorporando proteínas recombinantes (aproximadamente en 1992), no se podía diferenciar una infección por HTLV-I de una producida por HTLV-II. La única forma de diferenciar dichas infecciones había que buscarla en técnicas moleculares, como el southern blot. No obstante, debido al bajo número de linfocitos infectados en los individuos infectados por HTLV, esta técnica no era capaz de detectar el poco ácido nucleico presente.

Fue con la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuando se pudo diferenciar, sin problemas de cantidad de ácido nucleico disponible, los dos tipos de infección. La PCR es de gran ayuda en casos de seroindeterminados o de individuos seronegativos con factores de riesgo para la infección por HTLV. También es útil en los estudios de transmisión vertical, donde el estudio serológico del neonato podría no ser un indicativo relevante de infección.

Para poder realizar el diagnóstico de infección por HTLV-I/II mediante la detección de ADN vírico utilizando la técnica de PCR, ha sido necesario ajustar algunas variables de la técnica para poder obtener los mejores resultados posibles. Esta puesta a punto de la técnica se ha realizado para cada par de oligonucleótidos iniciadores (cebadores) utilizado en cada reacción. Hemos elegido dos sistemas de amplificación para realizar el estudio inicial de diagnóstico de infección por HTLV-I/II. Estos dos sistemas principales amplifican zonas específicas y conservadas de los genes pol y env. Además de los ensayos previos de ajuste de la

concentración de  $\text{ClMg}_2$  y de la temperatura de hibridación adecuada para ofrecer la máxima **especificidad** y mayor amplificación, se realizaron ensayos de **sensibilidad** con el fin de saber qué cantidad de ADN vírico es la mínima detectable por dicha técnica.

Realizamos una PCR-simple en los sistemas pol y env, que amplifican simultáneamente regiones del HTLV-I y del HTLV-II. Esta PCR-simple ha permitido detectar, mediante hibridación con sondas específicas marcadas radiactivamente, hasta 50 pg de ADN de la línea celular MT-2 (infectada por HTLV-I) y 5 ng de ADN de la línea celular C3/44 Mo (infectada por HTLV-II) en el sistema pol, con la máxima especificidad. El sistema env puede detectar 0.1 ng de ADN de la línea MT-2 y 0.1 ng de ADN de la línea C3/44 Mo.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo a la vez que diferenciar ambos tipos de virus, se ha llevado a cabo una segunda PCR utilizando el producto generado en la PCR-simple. Este tipo de PCR se denomina PCR-anidada y utiliza oligonucleótidos localizados internamente a los utilizados en la PCR-simple. En el sistema pol utilizamos tres oligonucleótidos en la misma reacción. Uno de ellos presenta una secuencia que le permite reconocer su secuencia homóloga tanto en el HTLV-I como en el HTLV-II; otro es específico para HTLV-I y el último lo es para HTLV-II. Con este sistema podemos diferenciar en una sola reacción los dos tipos de virus, puesto que los productos generados si fuera HTLV-I o HTLV-II tienen una longitud lo suficientemente distintas como para ser diferenciados claramente. En este caso, si es un genoma de HTLV-I, el producto generado es de 318 pb, mientras que si es HTLV-II, el producto tiene una longitud de 161 pb. Con este sistema y empleando sondas marcadas, podemos detectar 1.5 pg de ADN de la línea celular MT-2 (HTLV-I) y 5 pg de ADN de la línea celular C3/44 Mo (HTLV-II).

Con el sistema env de PCR-anidada se optó por la realización de dos reacciones por separado, una específica para HTLV-I y otra para HTLV-II. En el primer caso pudimos detectar 5 pg de ADN de la línea celular MT-2 y en el

segundo detectamos 5 pg de ADN de la línea celular C3/44.

Como dijimos en Resultados I, los ensayos han sido realizados hasta tres veces y por duplicado, con el fin de comprobar la repetibilidad de los resultados.

Comparando los resultados obtenidos directamente del gel teñido con los conseguidos utilizando sondas marcadas radiactivamente, se comprueba que el uso de sondas aumenta la sensibilidad del ensayo unas 10 veces cuando se realiza la PCR-simple, sin embargo, en la PCR-anidada hemos comprobado que este incremento de sensibilidad disminuye hasta ser de 3 veces. Una comparación realizada entre el grado de sensibilidad alcanzado por la PCR-simple y el alcanzado por la PCR-anidada, nos muestra que, sin la utilización de sondas radiactivas, la PCR-anidada aumenta la sensibilidad hasta 200 veces. Este enorme aumento de la sensibilidad permite a la PCR ser una técnica de gran ayuda en los casos en que la disponibilidad de ácido nucleico sea escasa.

Además de los sistemas pol y env, diseñamos otros dos sistemas de amplificación. Un sistema gag, específico para HTLV-I y un sistema tax/rex, específico para HTLV-II. Se hicieron las mismas pruebas de especificidad y de sensibilidad que para los sistemas pol y env.

La PCR-simple en el sistema gag, alcanza a detectar, sin la utilización de sondas marcadas, 50 pg de ADN de la línea celular MT-2, mientras que la PCR-anidada detecta 1.5 pg de este ADN. La PCR-simple en el sistema tax/rex, detecta 50 pg de ADN de la línea celular C3/44 Mo, mientras que la PCR-anidada detecta 1.5 pg.

El criterio adoptado para la interpretación de resultados ha sido el siguiente: a) una muestra se considera **positiva** cuando existe amplificación en las PCR-anidadas de los dos sistemas (pol y env). Este resultado final clasifica el tipo de infección en HTLV-I o HTLV-II. Cada muestra se realiza por duplicado, teniendo que coincidir ambos resultados. b) El resultado se considera **negativo**

cuando no se detecta amplificación en las PCR-anidadas de ambos sistemas. c) El resultado se considera **indeterminado** cuando sólo hay amplificación en una de las PCR-anidadas de los sistemas y se reproduce el mismo resultado en la muestra repetida. En este caso, se utilizan otras regiones del genoma vírico: sistemas gag (HTLV-I) y tax/rex (HTLV-II). Si el resultado de esta PCR-anidada es positiva, el resultado global es positivo, pero si el resultado es negativo, queda como indeterminado y a la espera de realizar una segunda prueba en una nueva muestra del caso en estudio.

La figura 1, representa los criterios de interpretación de los resultados por PCR.

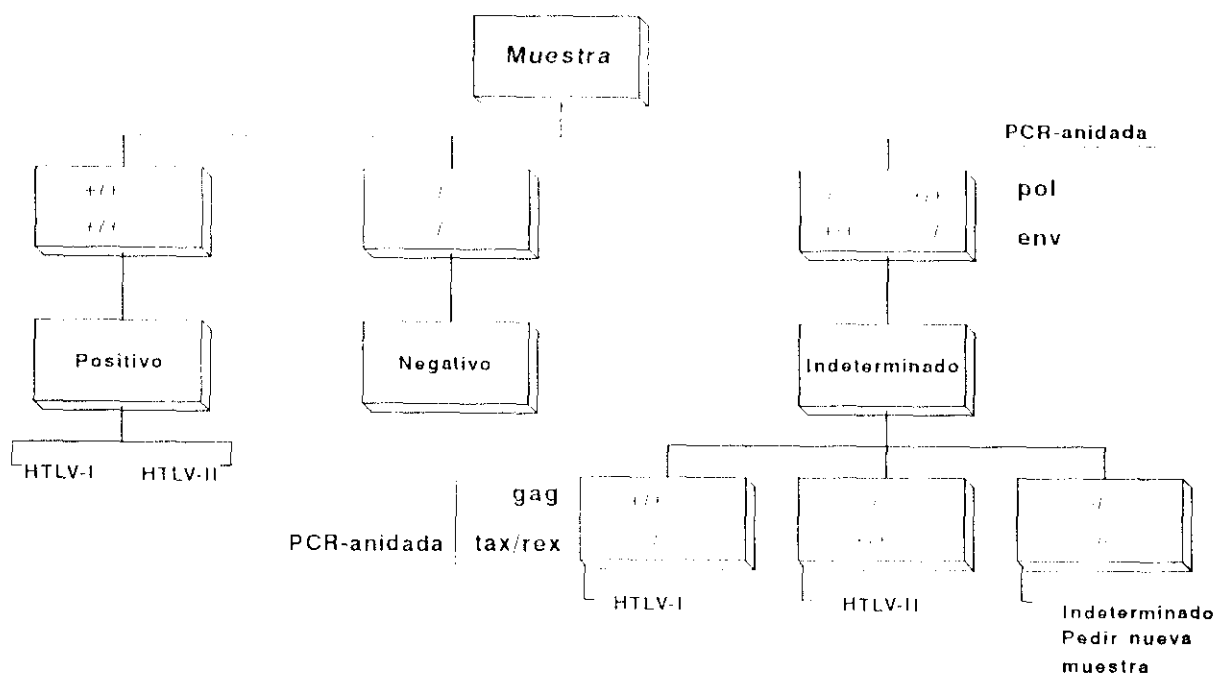


Figura 1

## **RESULTA2 II**

**Diagnóstico de infección por HTLV-I/II**

---

# 1. Estudio en muestras de Guinea Ecuatorial

## 1.1 Estudio serológico

Se ha realizado la detección de anticuerpos frente a HTLV-I/II a 1.129 sueros procedentes de población, mayoritariamente donantes de sangre, de Guinea Ecuatorial. Los resultados obtenidos por el ensayo de ELISA, se muestran en la figura 1. Treinta y seis sueros fueron repetidamente positivos (D.O./cut off mayor de 1). Los 36 sueros positivos en ELISA fueron analizados por IFI y WB-v3 para su confirmación y los resultados, agrupados según su valor creciente en ELISA (D.O./cut off), se muestran en la tabla I. Por IFI, se confirmaron como positivos 11 sueros, 24 resultaron con reacciones inespecíficas y 1 fue negativo. El WB-v3 confirmó 8 sueros y el resto los clasificó como indeterminados. El criterio de interpretación del WB-v3, se detalla en Materiales y Métodos.

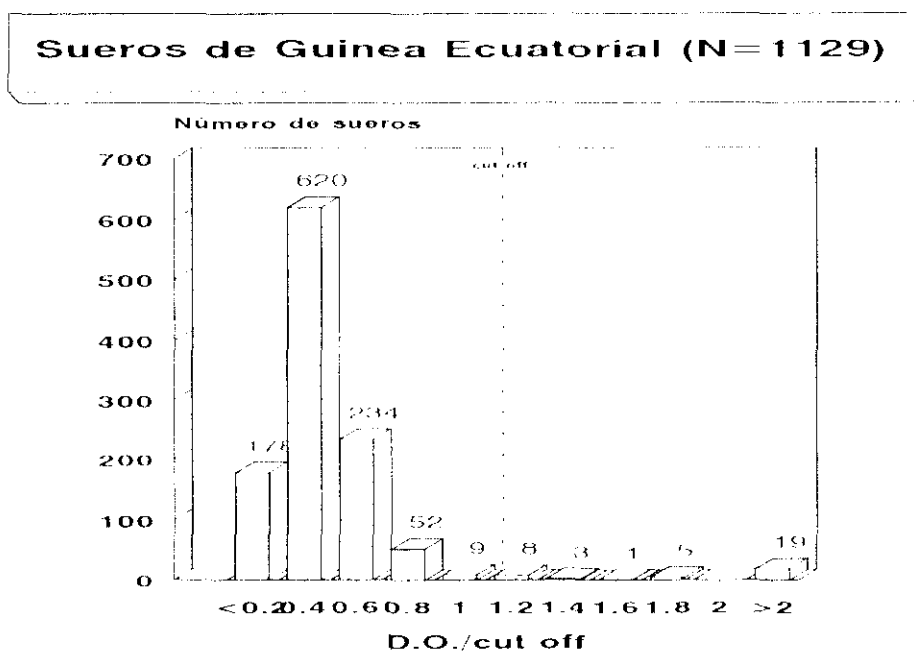


Figura 1



**TABLA I**  
**Estudio de muestras de Guinea Ecuatorial**

M	EIA	IFI	rgp21	p19	p24	p26	p28	p32	p36	gp46	p53	MTA-I	K55	Resul. WB-v3
368	1.01	RI	2	4	0	2	4	1	1	0	3	0	0	Ind
512	1.01	RI	0	4	0	2	4	1	1	0	3	0	0	Ind
799	1.02	RI	0	4	0	2	4	2	2	0	3	0	0	Ind
1157	1.02	RI	0	2	3	2	2	1	1	0	2	0	0	Ind
479	1.03	N	0	3	0	2	2	1	1	0	2	0	0	Ind
222	1.03	RI	0	3	0	2	2	1	1	0	2	0	0	Ind
741	1.18	RI	0	4	0	3	4	1	2	0	2	0	1	Ind
170	1.18	RI	0	4	0	3	4	1	2	0	2	0	0	Ind
510	1.21	RI	0	4	0	3	4	1	2	0	2	0	0	Ind
611	1.21	RI	3	4	0	3	4	1	2	0	2	3	0	I
1151	1.24	RI	0	4	0	3	4	1	2	0	3	0	0	Ind
924	1.41	RI	0	4	0	3	4	1	2	0	3	0	0	Ind
396	1.54	RI	0	4	0	3	4	2	2	0	3	0	2	Ind
108	1.64	RI	0	4	0	3	4	2	2	0	3	0	1	Ind
947	1.64	RI	0	4	0	3	4	2	2	0	4	0	0	Ind
972	1.66	RI	0	3	0	2	3	1	1	0	2	1	1	Ind
1068	1.68	RI	3	4	1	3	4	2	3	0	3	0	2	II
110	>2	P	0	4	2	3	4	2	3	0	3	0	0	Ind
164	>2	RI	0	3	1	3	4	2	3	0	3	0	0	Ind
226	>2	RI	0	4	0	3	4	2	3	0	4	0	0	Ind
274	>2	P	0	4	0	3	4	2	3	0	4	0	0	Ind
294	>2	P	0	4	0	3	4	2	3	0	4	1	1	Ind
385	>2	RI	1	4	0	3	4	2	3	0	4	2	2	I/II
409	>2	P	4	4	3	3	3	3	3	0	4	4	2	I/II
422	>2	P	0	4	1	4	4	3	3	0	4	0	3	Ind
438	>2	RI	4	4	3	3	4	3	3	1	4	4	0	I
462	>2	P	0	4	0	3	4	2	3	0	3	0	0	Ind
519	>2	RI	0	4	0	3	4	3	3	0	4	0	0	Ind
554	>2	P	4	4	4	4	4	3	4	1	4	4	0	I
650	>2	P	0	4	0	3	4	3	4	0	4	0	0	Ind
740	>2	RI	1	4	1	3	4	3	4	0	4	0	1	II
768	>2	P	0	4	0	4	4	4	4	0	4	0	1	Ind
988	>2	RI	2	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	I
989	>2	RI	0	4	0	4	4	3	4	0	4	1	0	Ind
1193	>2	P	3	4	0	3	4	3	4	0	4	0	0	Ind
1205	>2	P	0	4	0	4	4	3	4	0	4	1	2	Ind

M, muestra; EIA, razón DO/cut off en ELISA; P, positivo; N, negativo; RI, reacción inespecífica; 0, sin banda; 1, muy débil; 2, débil; 3, fuerte; 4, muy fuerte. I, positivo HTLV-I; II, positivo HTLV-II; I/II, positivo sin clasificar; Ind, indeterminado.

La tabla II, muestra el patrón de bandas de las proteínas principales de los sueros, observándose la presencia de p19 sólo en 22 casos, 4 sueros con p19 + p24, 4 con reactividad en rgp21 + p19 y 6 sueros reactivos a rgp21 + p19 + p24. La figura 2 recoge las tiras de WB-v3 de los sueros estudiados. Es importante destacar que todos los sueros presentan reactividad a p19. De los 8 sueros confirmados como positivos, 4 fueron clasificados como infección por HTLV-I, 2 como HTLV-II y 2 presentaron reactividad en las proteínas MTA-1 y K55, con lo que no se pudieron clasificar. Uno de estos dos últimos sueros (suero 409), presenta reactividad en p24, con lo que podría ser una coinfección HTLV-I y HTLV-II. El otro suero que presenta las dos reactividades (MTA-1 + K55), suero 385, no presenta reactividad en p24, reactividad imprescindible para la clasificación de HTLV-II, luego podría ser un caso de HTLV-I con reacción cruzada en la proteína K55.

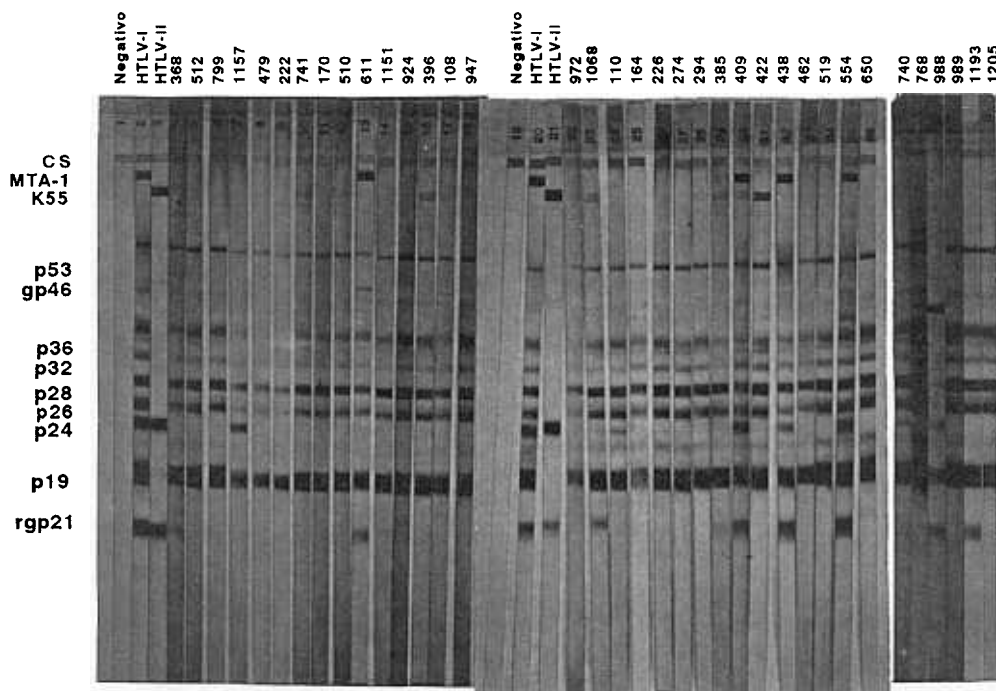
**TABLA II**  
**Patrón de bandas significativas en sueros de Guinea Ecuatorial**

	Número sueros
p19	22
p24	0
p19 + p24	4
rgp21 + p19	4
rgp21 + p24	0
rgp21 + p19 + p24	6
Total : 36	

Con el fin de realizar una confirmación de la infección por HTLV por PCR, teníamos que obtener una muestra de sangre heparinizada. Para ello nos trasladamos a Malabo y, con la colaboración del Dr. Agustín Benito (cooperante del CNMVIS en Malabo), pudimos localizar a los individuos y procesar la sangre heparinizada. Se obtuvo plasma y ADN de seis individuos, pertenecientes al estudio inicial. El plasma y el ADN se analizaron en el laboratorio de Diagnóstico

y Referencia del CNBCR (Instituto de Salud Carlos III) en Madrid.

Las seis muestras fueron las correspondientes a los casos 740, 222, 385, 396, 741 y 409. Dos sueros presentan reactividad a rgp21 más reactividad en K55, pero no presentan reactividad a p24 (imprescindible en para la clasificación de tipo). Un suero, la muestra 740, presenta reactividad en rgp21, p24 y K55, lo que lo clasifica como positivo a HTLV-II. Las tiras de este ensayo se muestran en la figura 2 y el esquema de los resultados en la tabla III. En este ensayo, ninguno de los sueros reaccionó con gp46. Los seis sueros fueron analizados también para la detección de anticuerpos anti-VIH y, en el Servicio de Parasitología del CNMVIS (Inst. Salud Carlos III), de Paludismo y Enfermedad del Sueño, infecciones muy comunes en Guinea Ecuatorial (el paludismo es endémico en el país). Relacionando este perfil serológico con el obtenido en la muestra inicial, vemos que las reactividades son mucho menores y que sólo se ha podido confirmar infección por HTLV en un caso, lo que no ocurrió con las muestras iniciales donde el suero 740 tenía un perfil de positividad a HTLV-II y los sueros 385 y 409, aunque no fueron clasificados, fueron positivos.



Patrón de bandas por WB-v3 de sueros de Guinea Ecuatorial

Figura 2

**TABLA III**

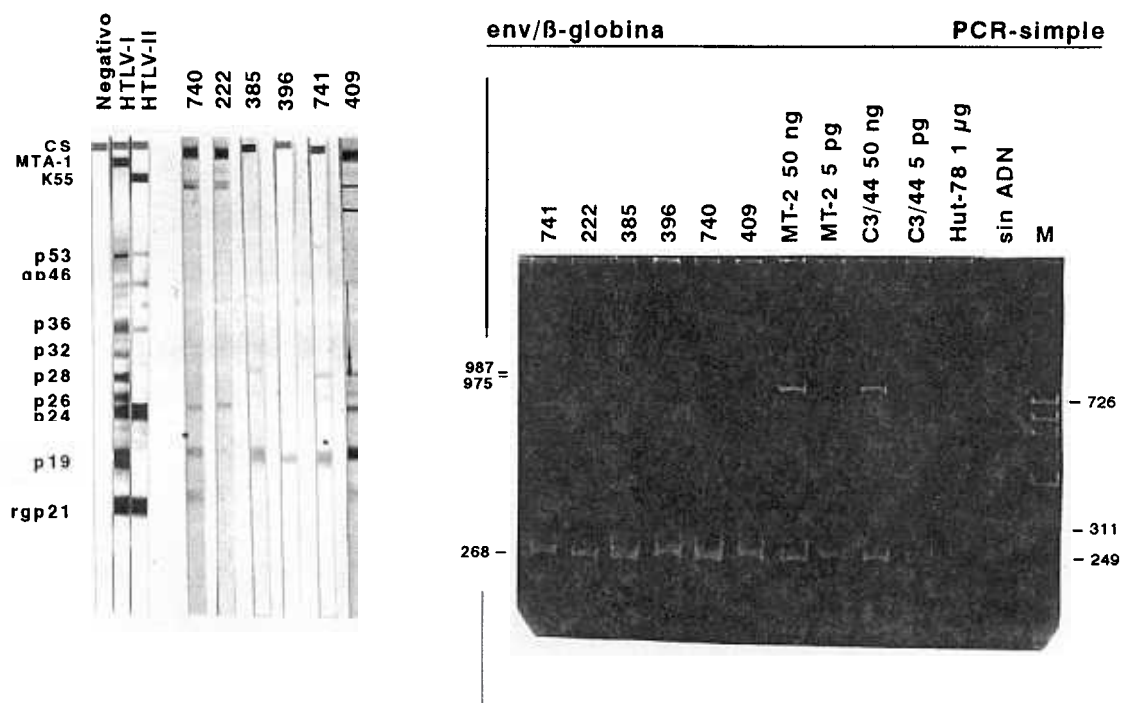
**Resultados de WB-v3 y PCR de seis muestras procedentes de Malabo**

Muestra	WB-v3	rgp21	p19	p24	p26	p28	p32	p36	gp46	p53	MTA-1	K55	Interp.	Paludismo	Enfer. Sueño	EIA VIII	PCR
222		0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	Ind	P	N	N	N
740		3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	II	P	N	N	N
385		0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	P	Ind	N	N
396		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	P	N	N	N
741		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	P	N	N	N
409		2	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	Ind	P	Ind	N	N

1, positivo HTLV-I; N, negativo; P, positivo; Ind, indeterminado; 0, sin banda. 1, banda muy débil.; 2, débil; 3, fuerte; 4, muy fuerte.

## 1.2 Amplificación por PCR

Las 6 muestras de sangre recogidas en Malabo se procesaron para la purificación de linfocitos y posterior extracción de ADN. El ADN se estudió por PCR-simple y anidada para la detección del provirus HTLV-I y/o HTLV-II. Los sistemas empleados en la amplificación fueron pol y env (figura 2).



**Patrón de bandas por WB-v3 y análisis de los productos de PCR de las seis muestras recogidas en Malabo**

**Figura 3**

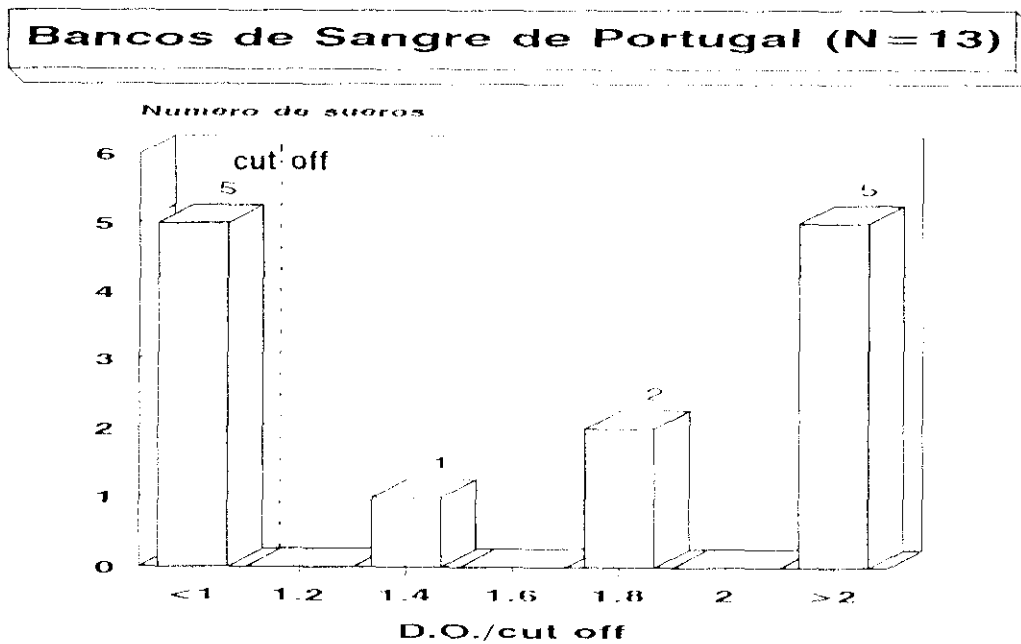
Los resultados de la amplificación mostrados en la figura 3, muestran la primera amplificación por PCR de la región env, a la que se añaden los oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen de la  $\beta$ -globina (gen presente en toda célula eucariótica) con el fin de comprobar el buen estado del ADN extraído. Se observa que los seis casos amplifican el fragmento de 268 pb correspondiente al gen de la globina y, sin embargo, no se observa amplificación del fragmento de 987/975 pb correspondiente al gen env del HTLV-I/II. El resultado de estas hibridaciones en ambas PCR-anidadas (env y pol) es negativo en las seis muestras.

## **2. Confirmación de infección por HTLV-I/II en Bancos de Sangre de Portugal**

### **2.1 Estudio serológico**

Se han estudiado 12 muestras (más 1 segunda muestra de una de ellas, 10214.2) repetidamente positivas por ELISA, procedentes de un estudio serológico de aproximadamente 12.000 muestras de donantes de sangre, realizado en Portugal. Para su confirmación, repetimos el ensayo de ELISA y se realizó IFI y western blot a todos ellos. El resultado de los ELISA se muestra en la figura 4. Ocho sueros dieron resultados positivos, mientras que 5 presentaron una razón DO/cut off menor de 1. Cinco sueros resultaron positivos mediante análisis por IFI, mientras que el resto fueron negativos. Los resultados se muestran en la tabla IV. Los sueros 9226, 5093, 10214.2 y 7388 fueron analizados mediante un ELISA que incorpora péptidos sintéticos específicos para cada tipo de virus. Sólo el suero

9226 resultó positivo para HTLV-I, mientras que el resto de los estudiados fueron negativos. Este análisis se llevó a cabo en colaboración con el Laboratorio de Referencia Abbott Científica, Chicago, Estados Unidos, donde también se realizó RIPA de los sueros 8944, 10214.1, 9226, 6182, 10060, 5093, 10214.2, 4728 y 7388, resultando positiva únicamente la muestra 9226, que reacciona fuertemente con el precursor gp68 (env).



**Figura 4**

**TABLA IV**

**Resultados del estudio de muestras en Bancos de Sangre de Portugal**

Muestras	IFI	PEPI	PEPII	RIPA	rgp21	p19	p24	p26	p28	p32	p36	gp46	p53	rgp46I	Interp.	PCR	Aisl.
596	P			NR	3	3	3	3	4	4	4	4	3	4	I	SM	SM
9226	P	29.4	1.15	P	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	I	Neg	Neg
5093	Neg	0.6	0.5	Neg	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	IIs	Neg	Neg
7388	Neg	0.6	0.45	Neg	3	3	1	3	3	1	1	0	1	0	IIs	SM	SM
8944	Neg			Neg	0	3	0	3	3	2	2	0	1	0	Ind	Neg	Neg
10060	P			Neg	0	3	0	3	3	2	2	0	1	0	Ind	Neg	Neg
10214.1	Neg			Neg	0	2	0	3	3	2	2	0	1	0	Ind	Neg	Neg
10214.2	Neg	1.1	0.95	Neg	0	2	0	3	3	2	2	0	1	0	Ind	Neg	NR
8053	Neg			NR	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	SM	SM
4728	Neg			Neg	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0	Ind	Neg	Neg
6182	Neg			Neg	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0	Ind	SM	SM
6391	P			NR	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
7890	P			NR	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	Ind	SM	SM

PEPI y PEPII, son ELISAs que incorporan péptidos sintéticos específicos para HTLV-I y HTLV-II respectivamente, considerando reactiva una muestra cuando es mayor o igual a 3.0; Interp., interpretación del WB-plus; Aislam., aislamiento por cocultivo; I, positivo para HTLV-I; IIs, sospechoso de HTLV-II; P, positivo; Neg, negativo; Ind., indeterminado; NR, no realizado; SM, sin muestra.



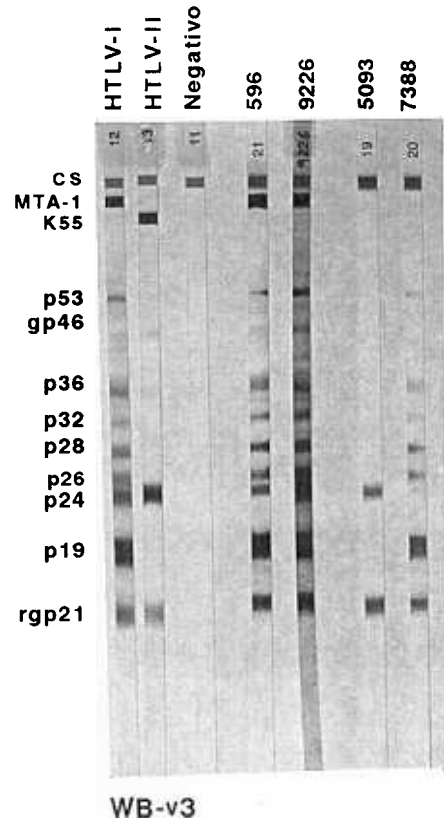
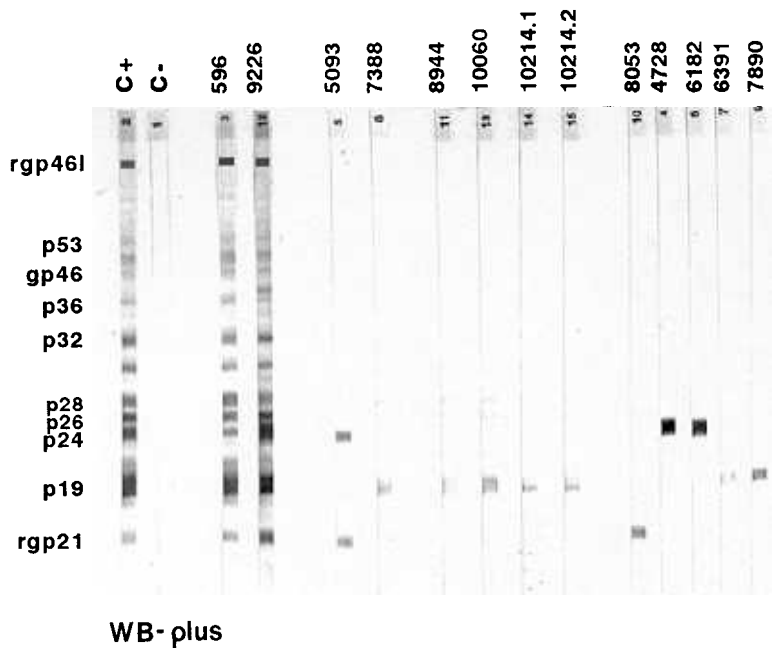
Se realizó un estudio por WB-plus de todos los sueros, confirmándose como HTLV-I los sueros 596 y 9226. Los sueros 5093 y 7388 no presentan reactividad en la proteína gp46, aunque sí en rgp21 y p24, por lo que se consideran como sospechosos de infección por HTLV-II. El resto de los sueros fueron clasificados como indeterminados (figura 4). Los sueros 596, 9226, 5093 y 7388 se analizaron por WB-v3, confirmándose de nuevo la infección por HTLV-I de los sueros 596 y 9226, debido a que presentan reactividad en la banda MTA-1 que tipifica como HTLV-I a estos sueros. Sin embargo, los sueros 5093 y 7388 no dieron reacción en la banda de la proteína K55 (ni en MTA-1) con lo que no se pudieron clasificar (figura 5).

## **2.2. Amplificación por PCR**

Se analizó el ADN en 8 muestras, observándose la banda de 268 pb correspondiente al gen de la  $\beta$ -globina en todos los casos estudiados (figura 4), lo que demuestra la presencia y la calidad del ADN analizado. En las hibridaciones de las PCR-anidadas de los genes env y pol, sólo se observa la banda específica de 198 pb para el gen env y la banda de 318 pb para el gen pol, ambos correspondientes al genoma del HTLV-I, en la muestra 9226 (serológicamente tipado como HTLV-I; tabla III, figura 9). Por el contrario, ninguno de los restantes ADNs presenta positividad en ninguno de los dos genes estudiados.

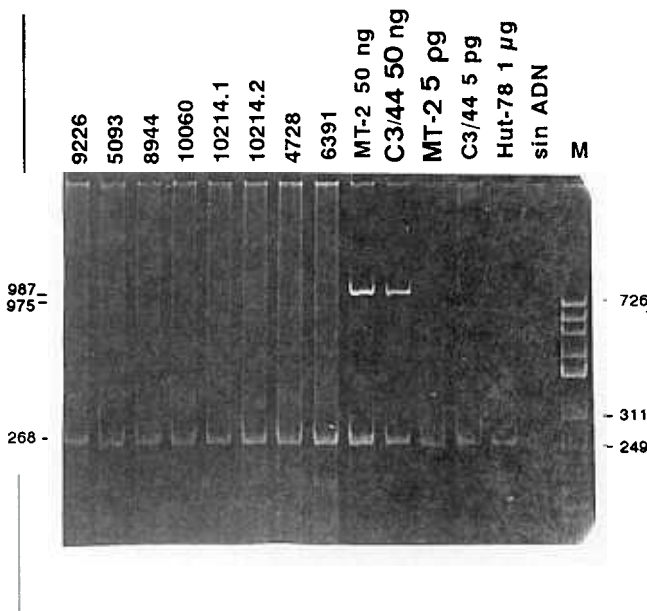
## **2.3. Aislamiento**

Linfocitos de las muestras 9226, 5093, 8944, 10060, 10214.1 y 4728 se cocultivaron con PBLs de donante sano con el fin de poder confirmar la infección. Algunas de las muestras recibidas no pudieron ser cultivadas por llegar contaminadas al laboratorio. Los cocultivos se mantuvieron durante cuatro semanas, al término de las cuales, se analizó el sobrenadante para la detección de antígeno p24 de HTLV. No se detectó antígeno en ninguno de ellos, incluida la muestra 9226 que está clasificada como HTLV-I.



env/ $\beta$ -globina

PCR-simple



**Patrón de bandas por WB-plus y WB-v3 y análisis de los productos de PCR de las muestras de Bancos de Sangre de Portugal**

**Figura 5**

### 3. Confirmación de infección por HTLV-I/II en Bancos de Sangre en España

#### 3.1. Estudio serológico

Un estudio multicéntrico de 21.921 sueros procedentes de Bancos de Sangre de distintas comunidades españolas por la técnica ELISA y realizado entre los meses de septiembre y noviembre de 1992, dió como resultado la detección de 26 muestras repetidamente reactivas, o en una zona inferior en un 10% del cut off. Estas 26 muestras fueron estudiadas por ELISA en nuestro laboratorio, indicándose en la tabla IV los datos de la razón DO/cut off obtenidos (figura 6). El estudio por IFI mostró como negativos todos los sueros (Tabla V). El estudio por WB-v3 no confirmó como positivo ninguno de los sueros estudiados; 7 fueron negativos y 19 indeterminados (figura 7).

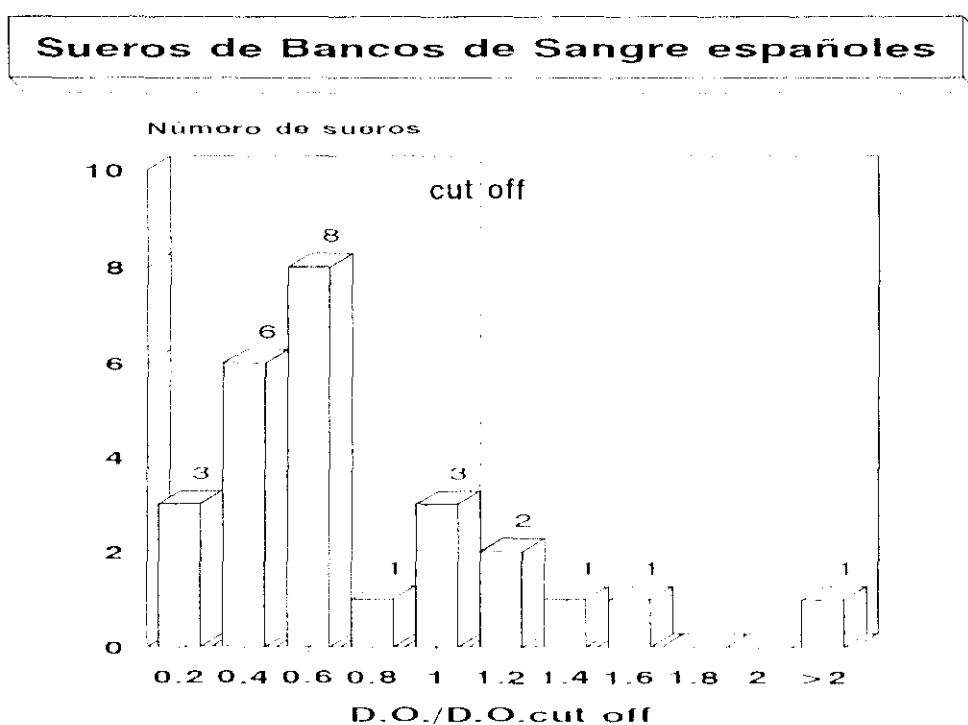
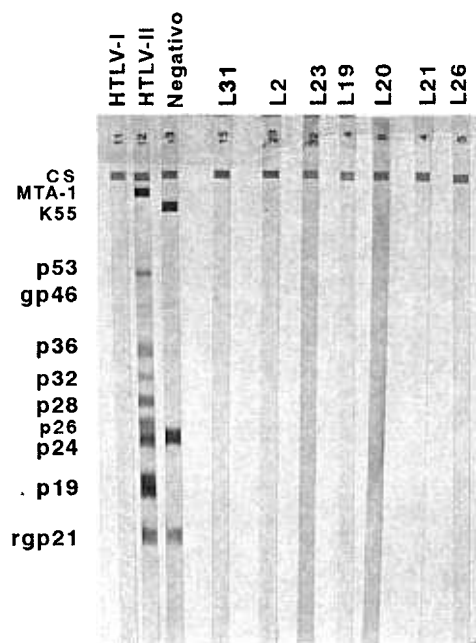
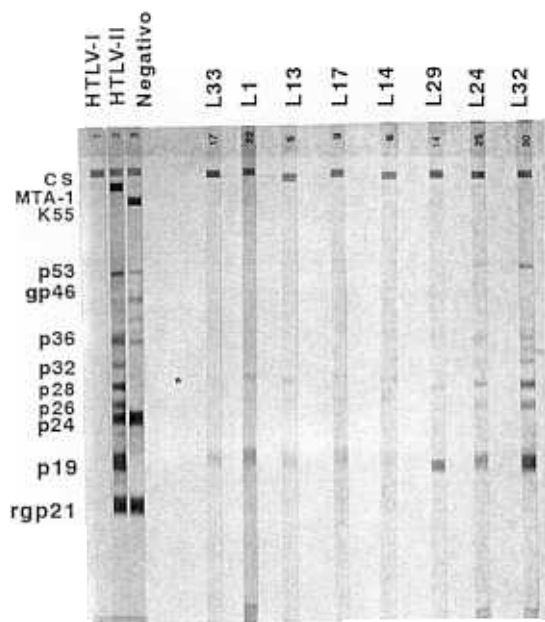
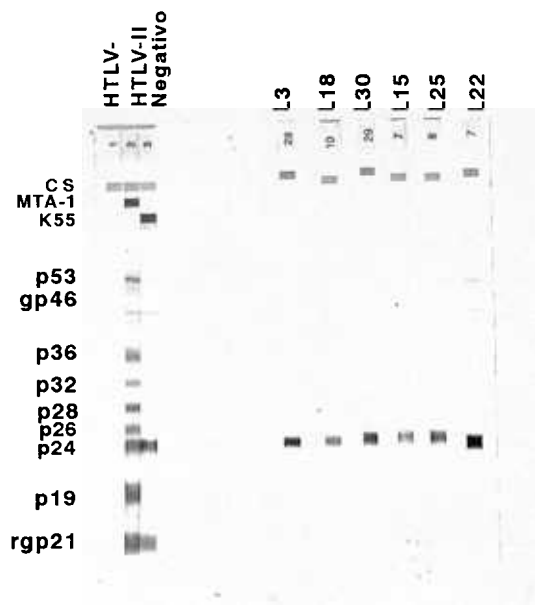


Figura 6



**Patrones de bandas por WB-v3 de las muestras españolas**

**Figura 7**

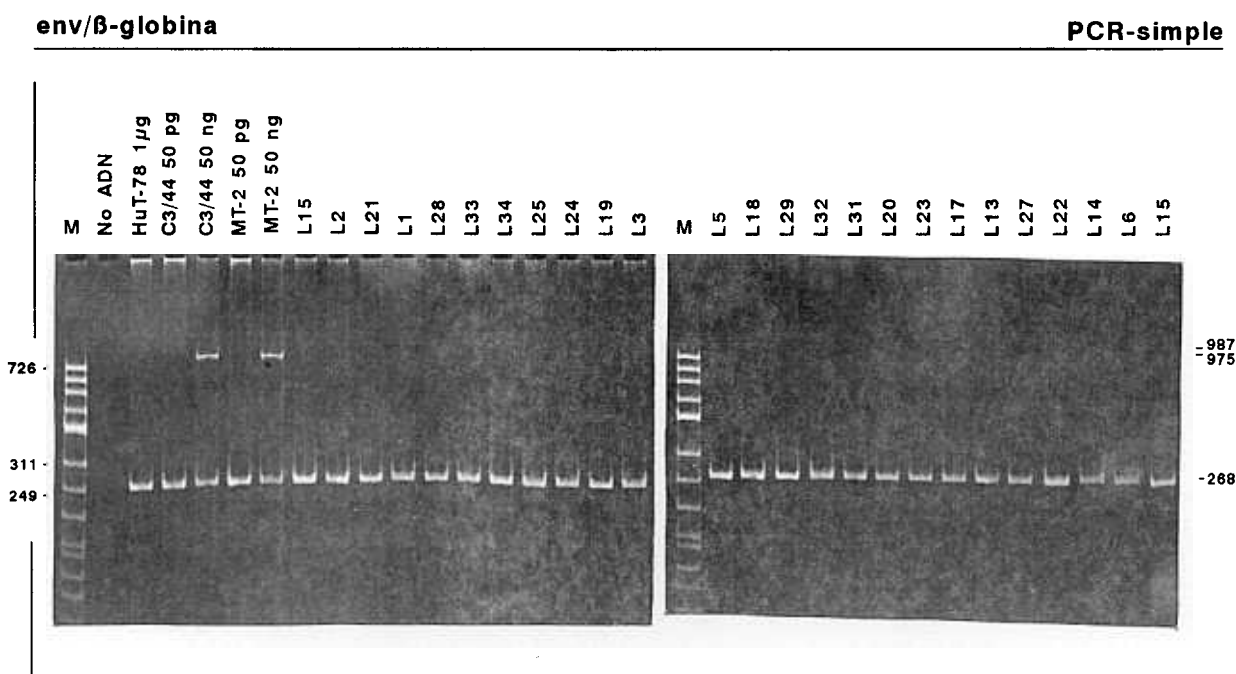
TABLA V. Estudio en Bancos de Sangre españoles

Muestra	ELISA	PEPI	PEPH	IFI	WB-v3 :	rgp21	pl9	p24	p26	p28	p32	p36	gp46	p53	K55	MTA-1	Interpret.	PCR	Alslam.
L26	0.09	0.55	0.68	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L2	0.12	1.04	1.32	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L21	0.19	1.68	1.63	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L1	0.20	0.9	0.95	Neg		0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L28	0.20	0.53	0.73	Neg		1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
L33	0.21			Neg		0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
L34	0.32			Neg		0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L25	0.33	0.91	1.1	Neg		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
L24	0.39	0.79	0.87	Neg		0	2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	Ind	Neg	NR
L19	0.41	0.31	0.41	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L3	0.42	0.77	0.72	Neg		0	0	3	0	3	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L5	0.43	0.80	1.16	Neg		2	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
L18	0.44	0.60	0.74	Neg		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	Neg	Neg
L29	0.45	0.64	0.73	Neg		0	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	Ind	Neg	Neg
L32	0.46			Neg		0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	Ind	Neg	NR
L31	0.47	0.48	0.48	Neg		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L20	0.57	5.83	5.20	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L23	0.72	4.31	3.81	Neg		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Neg	Neg	NR
L17	0.88	0.66	0.68	Neg		0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L13	0.93	0.35	0.45	Neg		0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L27	0.99	0.51	0.63	Neg		3	0	4	3	3	2	2	0	3	0	0	Ind	Neg	Neg
L30	1.08	1.08	1.08	Neg		0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	Ind	SM	SM
L22	1.20	0.98	0.93	Neg		0	0	4	0	0	0	0	1	2	0	0	Ind	Neg	Neg
L14	1.28	0.85	1.04	Neg		0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	NR
L6	1.47	0.66	0.78	Neg		1	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	Neg
L15	2.12	0.75	0.78	Neg		0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	Ind	Neg	Neg

El estudio de estos 26 sueros se realizó en colaboración con un laboratorio de Estados Unidos, donde se realizaron las técnicas de ELISA, con péptidos sintéticos específicos para HTLV-I y HTLV-II, y de radioinmunoprecipitación (RIPA) (tabla V). Por RIPA solo se detectó reactividad en gp68 en la muestra L30, sin mostrar reactividad en ninguna otra banda.

### 3.2. Amplificación por PCR

En los casos donde se pudo obtener ADN, éste se amplificó por PCR en los genes env y pol. La amplificación de la banda de 268 pb gen de la  $\beta$ -globina se observa en todos los casos, sin embargo, no existe señal positiva específica de HTLV-I o HTLV-II en las hibridaciones de las PCR-anidadas de los mismos, en los sistemas pol env (figura 8). Por tanto, todas las muestras estudiadas son



**Análisis por PAGE de los productos de PCR de las muestras españolas**

**Figura 8**

### **3.3. Aislamiento**

Los PBLs de los casos L18, L29, L27, L22, L6 y L15, se cocultivaron con PBLs de donante sano durante cuatro semanas. Al cabo de ese tiempo se realizó una detección de antígeno p24 en los sobrenadantes. Ninguno de los cultivos presentó positividad en este ensayo (tabla V).

## **4. Estudio de detección de HTLV-I/II en muestras de población ADVP (El Patriarca)**

### **4.1. Estudio serológico**

Se analizaron 149 muestras de suero procedentes de población ADVP (El Patriarca) mediante ELISA e IFI. Los resultados de la relación D.O/cut off se muestran en la figura 9. Sólo el suero DP106 mostró una razón DO/cut off mayor de 1. Este mismo suero mostró positividad en IFI, mientras que el resto resultó negativo.

El suero DP106 se analizó por WB-v3 para su confirmación y tipado. Se observa reactividad en todas las bandas específicas, incluidas las de rgp21 y K55, lo que permitió clasificarlo como una infección por HTLV-II (figura 11).

## Sueros del Patriarca (N=149)

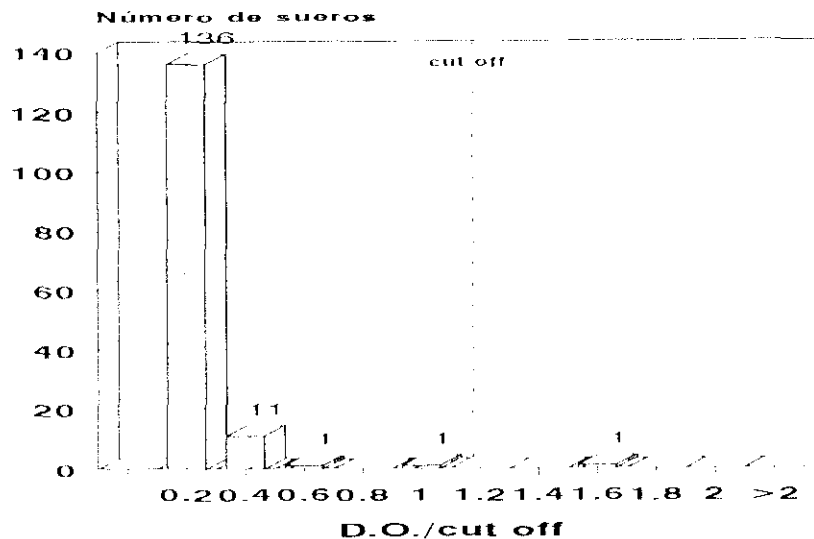


Figura 9

### 4.2. Amplificación por PCR

Se realizó la extracción del ADN de la muestra DP106 para su estudio por PCR en los sistemas env y pol. En la PCR-simple no se pudo observar bandas específicas en ninguno de los dos sistemas, sin embargo, en la PCR-anidada se pudo observar la presencia de las bandas correspondientes a 203 y 318 pb de las regiones correspondientes a los genes env y pol, respectivamente, del genoma de HTLV-II (figura 11).

### 4.3. Aislamiento

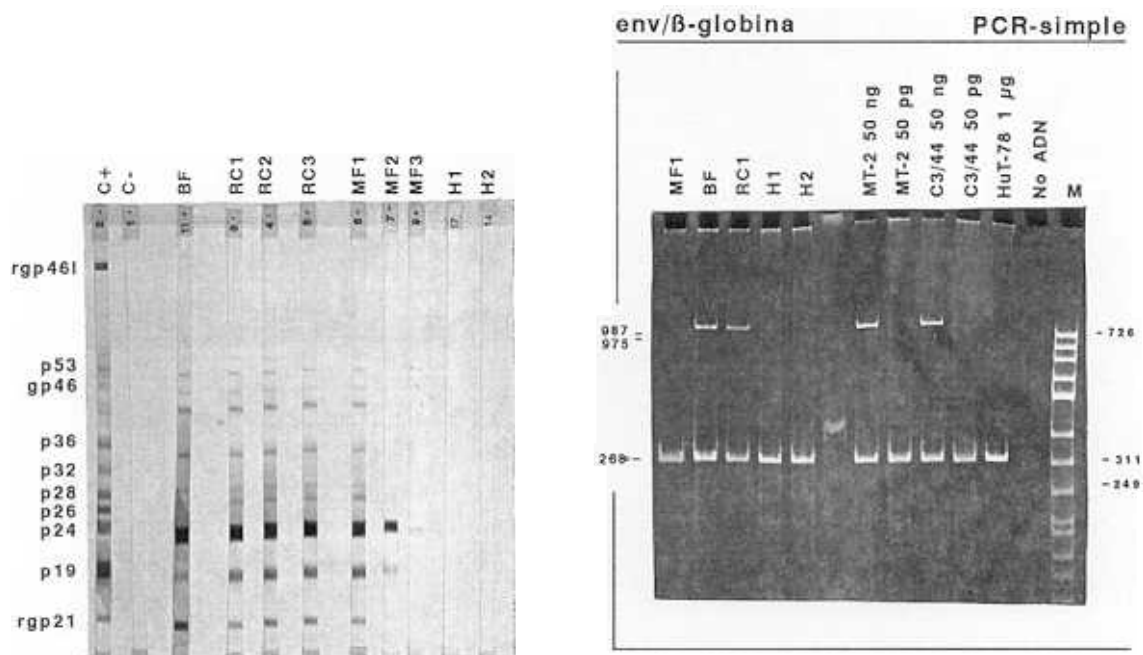
Los PBLs obtenidos del caso DP106 se pusieron en cocultivo con CBLs y PBLs de donante sano para el aislamiento del HTLV-II. Alrededor de la cuarta semana de cultivo se pudo detectar la presencia de antígeno p24 en el sobrenadante (figura 13). A la quinta semana de cultivo se realizó una nueva PCR y se confirmó la presencia de genoma específico de HTLV-II.



## **5. Estudio de infección por HTLV-I/II en los miembros de una familia**

### **5.1. Estudio serológico**

Se realizó un estudio serológico inicial del caso de una mujer (RC1), prostituta, seronegativa a VIH y seropositiva a HTLV y de su hija recién nacida (MF1). El estudio reveló seropositividad en los dos casos (por ELISA e IFI), clasificándose como sospechosos de infección por HTLV-II por WB-plus. Posteriormente, quisimos comprobar el estado serológico de la pareja (BF) y de los dos hijos mayores (IH1 y IH2). Para ello, obtuvimos sangre heparinizada de los cinco miembros de esta familia. El estudio preliminar de ELISA reveló positividad en los sueros de los casos RC2, MF2 y BF. Asimismo, se obtuvo resultado positivo en estos tres casos mediante IFI. La confirmación de estos resultados por WB-plus, clasifican como sospechosos de HTLV-II los tres sueros, ya que no presentan reactividad a la proteína rgp46I, pero sí a p24 y rgp21 (figura 10). Se hizo un seguimiento serológico del caso MF, debido a que su seropositividad podría deberse únicamente a anticuerpos procedentes de la madre seropositiva. Si esto fuera así, en los sucesivos análisis se observaría una desaparición de los anticuerpos específicos. A tal efecto, pudimos obtener otras dos muestras del caso MF con intervalos de aproximadamente 4 meses (muestras MF1 a MF3) y de cerca de un año con la muestra MF4. Los resultados del WB-plus, claramente demuestran la desaparición progresiva de los anticuerpos anti-HTLV-II en las muestras MF2 y MF3 (figura 10). La muestra MF4 no se muestra, pero presenta un perfil negativo en este WB. Los sueros RC y BF se analizaron con el WB-v3 para poder clasificarlos como HTLV-II. El suero BF reaccionó con todas las proteínas específicas, incluida K55, lo que clasifica como HTLV-II positivo a este suero. Sin embargo, el suero RC, no presente reactividad frente a K55, pero sí al resto de proteínas específicas, no pudiendo tipificarse por este método.



**Patrón de bandas por WB-plus y análisis por PAGE de los productos de PCR de los sueros de los miembros de una familia**

**Figura 10**

## 5.2. Amplificación por PCR

Se realizó extracción de ADN de todas las muestras obtenidas (menos la muestra MF4). Todos los ADNs mostraron amplificación de la banda de 268 pb correspondiente al gen de la  $\beta$ -globina. Además, los casos RC1 y BF, muestran la banda específica de 987/975 del gen env de HTLV (figura 10). Las PCR-anidadas demostraron bandas de 203 y 161 pb de los genes env y pol, respectivamente, del HTLV-II. Sin embargo, las hibridaciones realizadas en las PCR-anidadas no mostraron positividad en las muestras MF1, MF2, MF3, H1 y H2.

### **5.3. Aislamiento**

Los PBLs de todas las muestras (excepto MF3 y MF4) fueron cocultivados con CBLs y PBLs de donante sano. A partir de la cuarta semana se pudo detectar antígeno p24 específico en los cocultivos de las muestras RC1, RC2 y BF, tanto en los CBLs como en los PBLs (figura 11). En el resto de los cultivos no se detectó antígeno en las cinco primeras semanas de cultivo, con lo que se dejó de cultivar.

Los cultivos RC1, RC2 y BF cocultivados con PBLs se mantuvieron durante aproximadamente seis meses, alimentando el cultivo con PBLs de donante sano cada semana durante las primeras cuatro, para dejar de alimentar durante el resto del cultivo. No se pudo continuar con los cultivos de CBLs por falta de disponibilidad de éstos.

## **6. Confirmación de infección por HTLV-I/II en dos casos ADVP**

### **6.1. Estudio serológico**

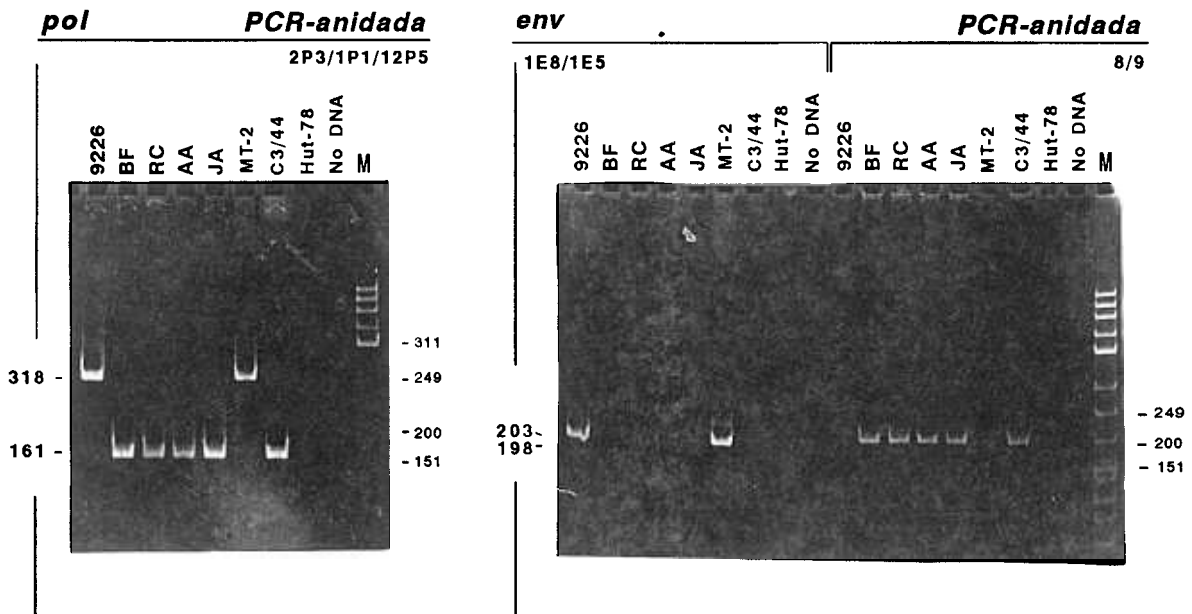
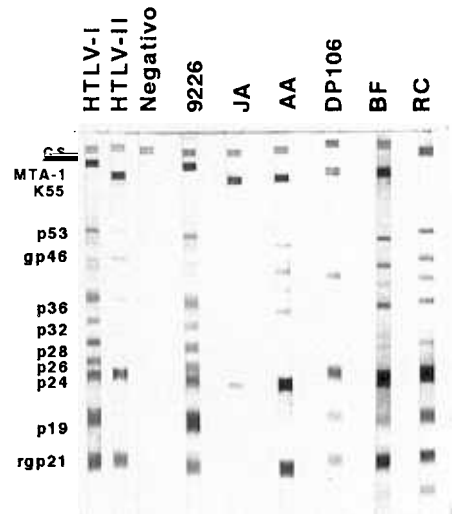
Dos casos seropositivos para VIII y ADVP (AA y JA), fueron estudiados para detectar anticuerpos anti-HTLV. Los resultados de ELISA e IFI fueron positivos para el caso AA, sin embargo, el caso JA tuvo un valor de D.O muy cercano al cut off del ensayo y su IFI resultó negativa. El WB.v3 dio resultado positivo en los dos casos, pudiéndose tipar como infecciones por HTLV-II (figura 11).

## **6.2. Amplificación por PCR**

El ADN de los dos casos fue analizado por PCR en el gen pol, obteniéndose una banda de 398 pb, en los dos casos, que se resolvió en una banda de 161 pb (específica de HTLV-II) después de realizar la PCR-anidada. En el gen env aparece una banda de 987/975 pb en los dos casos y una banda de 203 pb (específica de HTLV-II) en la PCR-anidada de los dos casos (figura 12).

## **6.3. Aislamiento**

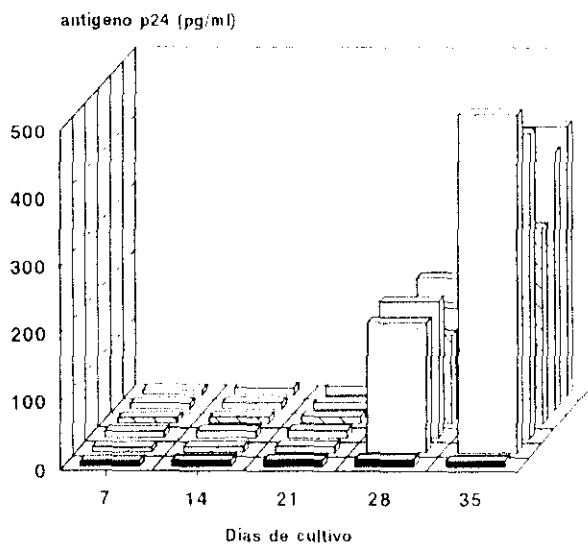
Se cocultivaron los linfocitos de los dos individuos con CBLs y PBLs de donantes sanos, detectándose antígeno p24 de HTLV a partir de la tercera semana de cultivo (figura 12). En la quinta semana se realizó una PCR, confirmándose como HTLV-II la infección de los dos cultivos.



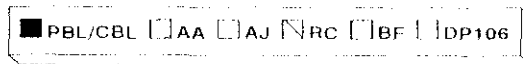
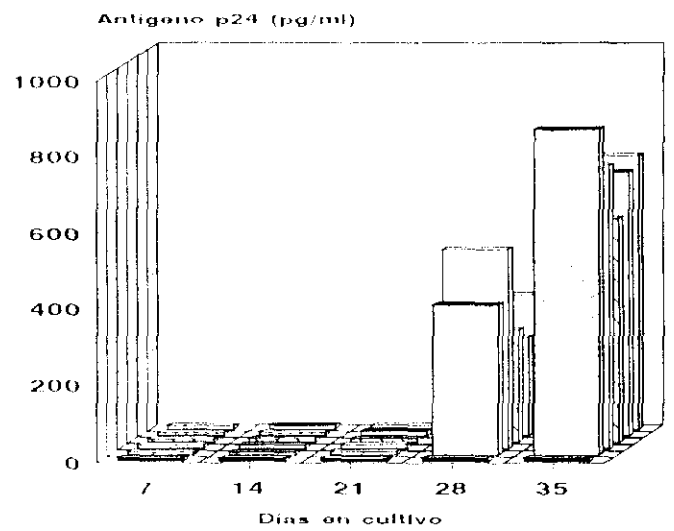
**Patrón de bandas por WB-v3 y análisis por PAGE de las PCR-anidadas de los genes *pol* y *env* de los casos 9226, AA, AJ, RC y BF**

**Figura 11**

### Cocultivo en PBL



### Cocultivo en CBL



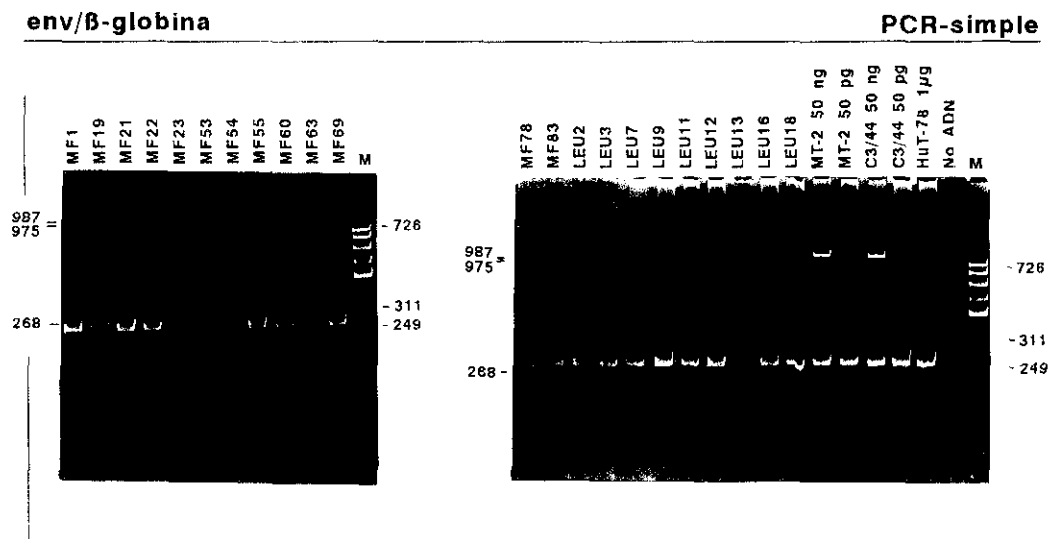
**Detección de antígeno p24 de HTLV en los cocultivos de los cinco aislados de HTLV-II (DP106, AA, JA, RC y BF)**

**Figura 12**

## 7. Estudio en muestras procedentes de patologías cutáneas

### 7.1. Amplificación por PCR

Las 22 muestras de ADN, MF y LEU, diagnosticadas como *micosis fungoides*, fueron analizadas por PCR en los genes *pol* y *env*. En la PCR-simple del gen *env* y el gen de la  $\beta$ -globina observamos una banda de 268 pb, correspondiente al gen de la  $\beta$ -globina, en todos los casos estudiados, indicando la presencia y la buena conservación del ADN. Sin embargo, no se observan bandas específicas de HTLV en ningún caso, realizando hibridaciones de las PCR-anidadas de los dos genes (figura 13).



Análisis por PCR del gen *env* de HTLV y del gen de la  $\beta$ -globina en los casos de patologías cutáneas.

Figura 13

## **DISCUSSION II**

---



## **1. Estudio de seroprevalencia en una población de Africa ecuatorial (Guinea Ecuatorial)**

Hemos estudiado 1.129 sueros procedentes, mayoritariamente, de donantes de sangre y, en menor medida, de embarazadas, tuberculosos e individuos relacionados con ETS, recogidos en el Hospital general de Malabo gracias a la Cooperación Técnica Española. El análisis por ELISA detectó 36 sueros con una razón DO/cut off mayor de 1. Estos 36 sueros se analizaron posteriormente por IFI y western blot para su confirmación. La confirmación serológica de infección por estos virus depende de la presencia de reactividad de anticuerpos frente a productos génicos de gag y env. La interpretación de los resultados serológicos en sueros de origen africano ha presentado muchas dificultades.

El estudio por IFI detectó un alto número de reacciones inespecíficas que impidieron una interpretación clara del resultado. Por tanto, consideramos que el uso de la técnica de IFI no resulta muy adecuado al estudio de sueros africanos. Esta opinión está de acuerdo con lo descrito por otros autores (Verdier y cols., 1990).

Hasta hace poco, no se disponía de un ensayo serológico que diferenciara anticuerpos anti-HIV-1 y anti-HIV-2, por lo que era necesaria la detección de ácido nucleico específico para diferenciarlas. Recientemente (para uso en investigación) se están desarrollando western blots que incorporan proteínas recombinantes específicas de cada virus que permiten diagnosticar y diferenciar ambos tipos de infección. Uno de éstos, es el usado en este trabajo (WB-v3). El patrón de bandas observado por WB-v3, permitió clasificar como positivos a HIV a 8 sueros, mientras que el resto fueron indeterminados. De los 8 sueros positivos, cuatro fueron tipificados como HIV-1, dos como HIV-2 y los dos restantes reaccionaron con ambas proteínas recombinantes (MTA-1 y K55) con lo que no se pudieron clasificar. La falta de reactividad frente a las proteínas tipo-

específicas, podría ser debido a una limitada sensibilidad del ensayo o a la falta de reconocimiento inmune por algunos individuos. Estos resultados serológicos deberían ser confirmados por otros métodos, como RIPA y/o PCR. Para la realización de PCR tratamos de conseguir una muestra de sangre de los casos estudiados, pero fue imposible obtener muestra de sangre de todos ellos. En realidad, sólo pudimos localizar 6 individuos del estudio. Los seis sueros presentaron patrones de bandas diferentes a los encontrados en la muestra inicial, no confirmándose la infección por HTLV en ninguno de ellos. Tampoco pudimos detectar presencia de genoma específico en ninguno de ellos.

Por lo tanto, detectamos 8 sueros confirmados como positivos por WB-v3 de un total de 1.129 sueros, lo que supone una **incidencia de infección por HTLV del 0.7%**. Hay que destacar la presencia de infección por HTLV-II, algo relativamente poco común en esta región geográfica, aunque hay trabajos que describen este tipo de anticuerpos en sueros africanos (Goubau y cols., 1993).

Las seis muestras que pudimos obtener en Malabo, correspondientes a las muestras 741, 222, 385, 396, 740 y 409, se analizaron con el WB-v3, que incorpora proteínas recombinantes específicas para cada virus. El suero 740 se clasificó como positivo para HTLV-II. El suero 222 presentó reactividad en MTA-1 y K55, así como en p24, sin embargo, no muestra reactividad en rgp21, por lo que se clasificó como indeterminado. Estas reactividades conjuntas a las proteínas recombinantes MTA-1 y K55, no suelen ser muy comunes, pero se han dado casos en estudios en Zaire donde aparecen sueros con doble reactividad y sueros sin ninguna reactividad a estas proteínas, siendo sueros positivos. Sin embargo, el estudio por PCR de estas muestras no logró detectar ninguna secuencia provírica ni de HTLV-I ni de HTLV-II, incluida la muestra 740.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que existen varias infecciones parasitarias muy comunes en ese país. El paludismo es endémico y las seis muestras resultaron positivas a dicha infección (datos facilitados por el Servicio de Parasitología del CNMVIS, ISCHD). Es posible, como se ha descrito, que

alguna de esas infecciones pueda dar lugar a cierta reactividad cruzada que interferiría en la interpretación de los resultados. Se ha demostrado una similitud estructural de los epítomos de las proteínas gag con otras proteínas microbianas y celulares, como por ejemplo con *Plasmodium falciparum* (McLaughlin y cols., 1987; Hayes y cols., 1991) y proteínas mielínicas (Liquori y cols., 1991). La reactividad única a proteínas gag, en ausencia de reactividad a proteínas env, podría ser debido a una baja sensibilidad del ensayo a esas proteínas, o una reacción cruzada con proteínas retrovíricas muy relacionadas, o podría representar una fase temprana de la infección por HTLV. Se debería tener en cuenta que los individuos con reactividad aislada de gag estuvieran infectados con alguna variante de los virus HTLV que posean una divergencia importante en las proteínas de la envuelta y, por eso, estos individuos no reaccionan con las cepas víricas prototipo. Una de tales variantes podría ser la aislada en Papúa Nueva Guinea (Yanagihara y cols., 1991).

## 2. Estudio de prevalencia en población general de un país europeo (Portugal) con destacada migración africana

En un estudio realizado en colaboración con un grupo de Bancos de Sangre de Portugal, basado en una muestra de alrededor de 12.000 sueros analizados, doce (más una muestra repetida), presentaron una razón DO/cut off en ELISA para la detección de anticuerpos anti-HTLV, mayor de 1 y fueron analizados para su confirmación en nuestro laboratorio. El estudio por IFI reveló cinco sueros positivos. Por tanto, dió como positivo a tres sueros que en posteriores estudios no fueron confirmados.

El análisis por WB-v3 de las muestras, clasificó como positivos los sueros 596 y 9226, además de tipificarlos como HTLV-I. Los sueros 5093 y 7388 no reaccionaron con ninguna proteína recombinante específica de tipo, con lo cual no pudieron ser tipificados. El resto de los sueros fueron considerados como indeterminados debido a que ninguno reacciona con la gp46, aunque alguno sí lo hizo con la rgp21.

**TABLA III**  
**Patrón de bandas por WB**

	<b>WB Positivo</b>	<b>WB Indeterminado</b>	
p19	0	6	
p24	0	2	
p19 + p24	0	0	
rgp21	0	1	
rgp21 + p19	0	1	
rgp21 + p24	0	1	
rgp21 + p19 + p24	2	0	
	2	11	<b>Total : 13</b>

Nueve sueros (incluidos los dos positivos) fueron analizados por RIPA (colaboración de un laboratorio de Estados Unidos) para detectar la presencia de anticuerpos frente a la proteína precursora gp68, ya que ninguno de los indeterminados mostró reactividad en gp46. Ninguno de los sero-indeterminados demostró presencia de banda gp68, lo que confirma los resultados, incluidos los sueros clasificados como sospechosos de infección por HTLV-II por el WB-plus. La muestra 9226, resultó positiva en RIPA. Esta última muestra pudo ser analizada por PCR, genes pol y env de HTLV-I y HTLV-II, y el resultado fue la detección de genoma específico de HTLV-I. De la otra muestra HTLV-I positiva, no pudimos obtener muestra de ADN. Las muestras sero-indeterminadas donde pudimos obtener ADN, resultaron negativas por PCR. Por otro lado, no conseguimos obtener replicación vírica en ninguno de los cocultivos realizados, incluida la muestra 9226 HTLV-I positiva.

En este estudio, hemos confirmado la sero-positividad debida a HTLV-I de dos muestras, que equivale a una tasa de 16/100.000, una de ellas HTLV-I positiva por PCR, mientras que el resto de las muestras presentan un patrón sero-indeterminado y fueron PCR y aislamiento negativas. Por tanto, parece que en población general es mayor la infección por HTLV-I que por HTLV-II, que es lo que ocurre en Francia, donde la infección por HTLV-I es mayoritaria, pero no así en Estados Unidos, donde el HTLV-I representa la mitad de las infecciones por HTLV.

### 3. Estudio de prevalencia en Bancos de Sangre de España

Para conocer mejor la prevalencia de infección por HTLV en España, y poder diferenciar los tipos de infección, se realizó un estudio multicéntrico con la participación de varios Bancos de Sangre españoles. El estudio se realizó a lo largo de tres meses, para impedir que dos muestras fueran del mismo donante (sólo se permite donar sangre cada tres meses). En cada Banco de Sangre se realizó el primer análisis de detección de anticuerpos por ELISA. Los sueros que presentaban una razón de D.O./cut off superior a 1 (o un 15% por debajo), se mandaron a nuestro laboratorio para su confirmación. De un total de 21.921 sueros analizados, 26 fueron enviados a nuestro laboratorio. Se repitió el ensayo de ELISA a todos los sueros, además de las técnicas de confirmación IFI, WB, PCR y aislamiento (cuando fue posible).

El análisis por IFI resultó negativo en todas las muestras estudiadas y el patrón de bandas observado por WB-v3 no confirmó sero-positividad en ninguna de las muestras, siendo sero-negativas 7 muestras. La tabla IV muestra el patrón de bandas observado en los sueros.

**TABLA IV**  
**Patrón de bandas por WB-v3**

	<b>WB Indeterminado</b>
p19	7
p24	8
rgp21 + p19	1
<u>rgp21 + p24</u>	3
	19

Como dijimos anteriormente, la aparición de reactividad gag y la ausencia de reactividad en gp46, puede deberse a varias causas. Debido a que los anticuerpos gag son de los primeros en aparecer en una seroconversión (Manns y cols., 1991), podría ser que las muestras que presenten reactividad en gag representen posibles seroconversiones. Sin embargo, ni el RIPA confirmó presencia de proteínas env, ni la PCR demostró presencia de genoma de HTLV en ninguno de los casos. Los anticuerpos anti-rgp21 (proteína de transmembrana) se ha visto recientemente que puede considerarse como un marcador de seroconversión (Mann y cols., 1991). En este estudio, ninguna de las muestras con anticuerpos anti-rgp21 y gag demostró presencia de genoma de HTLV por PCR, lo que cuestiona la posible seroconversión de dichos individuos. Por otra parte, el cocultivo de algunas de las muestras no permitió detectar replicación vírica al no detectarse antígeno p24 específico en ningún caso.

Del total de muestras estudiadas, no se pudo confirmar la presencia de infección por HTLV en ninguna de ellas. Las 19 muestras indeterminadas, sin embargo, nos pueden hacer pensar, primero, en la necesidad de plantear un seguimiento de al menos 1 año de estas muestras con el fin de observar las variaciones en los patrones de reactividad por WB, y segundo, en la posibilidad de considerar más detenidamente el problema de la detección de anticuerpos HTLV en los Bancos de Sangre españoles, porque, como hemos visto, en Portugal se han localizado dos casos HTLV-I positivos en donantes de sangre (16/100.000) y en Francia se ha descrito una prevalencia de 4.3/100.000. Por tanto, en nuestros países vecinos está confirmada la presencia de infección por HTLV y dado que somos país de paso de inmigrantes procedentes de Africa (Centro Africa tiene una alta prevalencia de infección por HTLV-I), sería razonable plantear una mayor atención a la difusión de este tipo de infecciones. Como sabemos, en Estados Unidos es obligatoria la detección de anticuerpos anti-HTLV en los Bancos de Sangre desde 1988 y en Francia desde 1991, posiblemente en nuestro país debería valorarse el interés sanitario de esta medida, aunque consideramos necesario completar con una muestra más amplia el estudio que aquí se ha expuesto.

#### **4. Estudio de detección de HTLV-I/II en muestras de población ADVP (El Patriarca)**

Se analizaron 149 sueros procedentes de población ADVP que residían en las dependencias de El Patriarca. En este estudio se localizó un suero que se confirmó como seropositivo a HTLV-II. Se confirmó por PCR y por aislamiento. En este estudio se alcanza un **0.67% de prevalencia**, además debida a HTLV-II, lo que está de acuerdo con la alta incidencia de HTLV-II entre población ADVP seropositiva a HTLV. La tasa de prevalencia obtenida en España, está muy por debajo de la descrita en Italia, donde se detecta hasta un 5% de seropositivos (De Rossi y cols., 1991), la mayoría debido a la infección por HTLV-II, aumentando a un 18% en individuos ADVP VIII positivos. El resto de los países europeos presentan una prevalencia muy baja de HTLV en población ADVP.

El aislamiento y, por consiguiente, la replicación del HTLV-II detectado, nos permitió seguir analizando dicho aislado, datos que se recogen en Resultados III.

#### **5. Estudio de infección por HTLV-I/II en los miembros de una Familia**

De un estudio realizado entre población con prácticas de prostitución, se obtuvo un **0.59%** de seroprevalencia a HTLV (Estébanez y cols., 1991). Pudimos localizar a una de esas mujeres seropositivas (RC) y obtener una muestra de sangre heparinizada. Por otra parte, quisimos obtener muestra de sangre de todos los miembros de esa familia, ya que supimos que su pareja era ADVP (BF) y



tenían una hija (MF) recién nacida que podría estar infectada (por transmisión vertical). También obtuvimos muestras de sangre de otros dos hijos mayores (H1, H2). Esto se pudo realizar gracias a la colaboración de la Dra. Barge (Consejería de Sanidad y Seguridad Social, Palma de Mallorca), que nos mandaba las muestras de sangre a nuestro laboratorio, así como los datos epidemiológicos donde se incluían las prácticas de riesgo de cada miembro familiar.

El estudio serológico demostró seropositividad en las muestras RC, BF y MF, mientras que H1 y H2 fueron seronegativas. El patrón de bandas de BF fue clasificado como HTLV-II por WB-v3, no obstante, la muestra RC no demostró reactividad con ninguna de las proteínas recombinantes específicas de HTLV-I o HTLV-II, por lo cual, no se pudo tipificar serológicamente. La seropositividad de MF podía ser debida a la presencia de anticuerpos de la madre, ya que éstos no desaparecen hasta transcurridos varios meses. Por eso, hicimos un seguimiento serológico del caso y recogimos tres muestras con intervalos de 3-4 meses y una última muestra 1 año después. A lo largo del análisis de estas muestras se vio que la reactividad disminuía a lo largo del tiempo hasta desaparecer por completo en la última muestra analizada. El estudio del ADN de las muestras por PCR demostró la presencia de genoma de HTLV-II en las muestras BF y RC. No se detectó genoma de HTLV en ningún otro miembro de la familia, incluida MF (en ninguna de las muestras obtenidas). Por tanto, no se confirma la transmisión vertical. Mediante cultivos celulares se ha demostrado la replicación vírica en los casos RC y BF (no así en el cultivo de MF), como se confirmó por la presencia de genoma de HTLV-II por PCR. Por otra parte, como BF es ADVP y seropositivo a HTLV-II, y RC no es ADVP pero practica la prostitución, podría ser que la infección inicial fuera a través de BF (vía utilización de agujas infectadas) y que éste hubiera transmitido la infección a RC por vía sexual. También podría ser que la infección de RC se produjera en alguno de los contactos sexuales con otras parejas dada su condición de prostituta, pero es poco probable dada la baja circulación de este virus. Estos dos HTLV-II (RC y BF) se estudiarán más profundamente en Resultados III.

## **6. Confirmación de infección por HTLV-I/II en dos casos ADVP**

Obtuvimos muestra de sangre de dos individuos ADVP y VIII positivos (procedentes del Hospital Vall D'Ebron de Barcelona) para la confirmación de la seropositividad a HTLV. Las dos muestras se estudiaron serológicamente, dando un resultado positivo por IFI en el caso de AA y negativo en el caso de JA. El patrón de bandas observado por WB-v3, confirma la seropositividad de los dos sueros, clasificándolos como infección por HTLV-II. El suero JA presenta una reactividad muy débil en gp46, aunque una reactividad fuerte en la proteína K55. Las dos muestras resultaron positivas en los cocultivos realizados con CBLs y PBLs de donante sano. Estos dos aislados (AA y JA) se estudiarán más detenidamente en Resultados III, donde se amplían los estudios a aspectos fenotípicos y moleculares.

## **7. Estudio en muestras procedentes de patologías cutáneas**

El virus linfotrópico de células T humano de tipo I (HTLV-I), cuando se aisló, parecía estar muy relacionado con neoplasias cutáneas, *micosis fungoide* (MF), y con su variante leucémica, el síndrome de Sézary. Sin embargo, después de numerosos estudios realizados en estas patologías cutáneas, esta relación no está muy clara. Es muy bajo el porcentaje de pacientes con MF clasificado, que tengan anticuerpos anti-HTLV-I. Por otra parte, existen trabajos donde consiguen detectar genoma de HTLV-I en pacientes con MF (Zucker-Franklin y cols., 1992).

Por eso, el HTLV-I sigue siendo el principal sospechoso en la enfermedad, aunque la detección de partículas víricas sólo se consiga en un bajo porcentaje de casos. En nuestro estudio de 22 muestras de pacientes con MF, no detectamos presencia de genoma de HTLV-I ni HTLV-II. Las muestras procedían de biopsias cutáneas, no disponiendo de muestra de sangre periférica para contrastar los resultados serológicos.

## **RESULTADOS III**

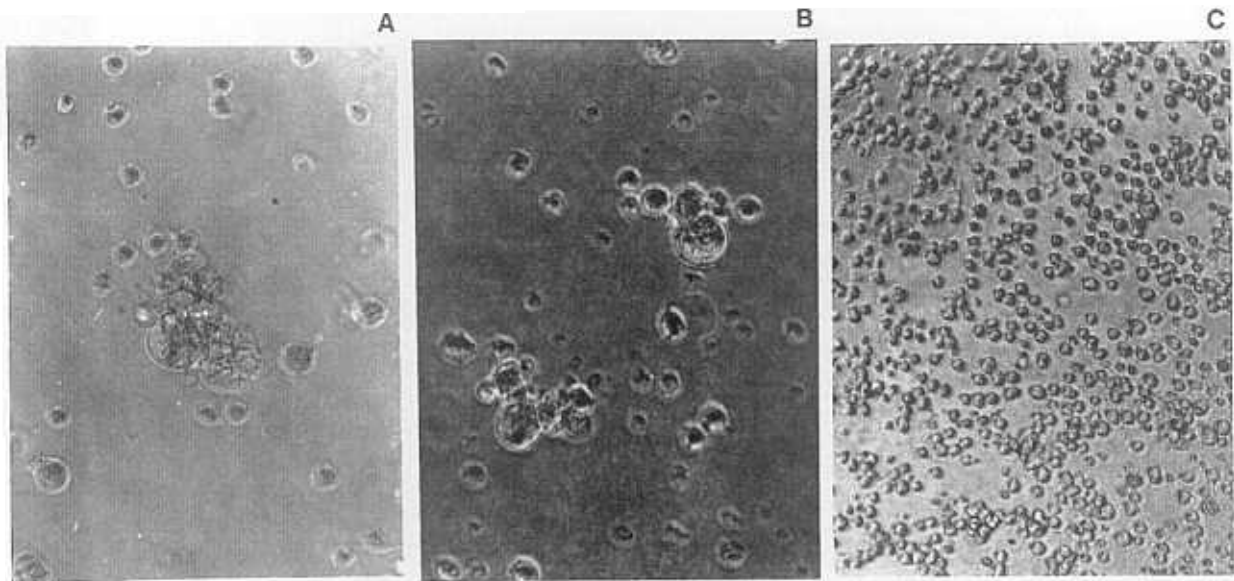
**Caracterización fenotípica, secuenciación  
y sensibilidad a zidovudina de aislados  
de HTLV-II españoles**

---

# 1. Caracterización fenotípica de los aislados de HTLV-II

## 1.1. Morfología y viabilidad celular

Las cinco líneas establecidas, en PBLs de donantes, de los aislados de HTLV-II, AA, JA, RC1, BF y DP106, fueron tratadas con mitomicina-C (MMC) con el fin de impedir su crecimiento. Después del tratamiento, estas líneas se cocultivaron con distintas líneas celulares establecidas; linfocíticas T, HuT-78 y Molt-3; monocíticas, U937-2 y THP-1; y linfocíticas B, Raji. Asimismo, se cocultivaron con PBLs de donante sano, para comprobar que la infectividad de los aislados se mantenía. Como control, para ver la eficacia del tratamiento con MMC, cada línea celular infectada por los aislados se cultivó aisladamente después del tratamiento y sin tratamiento, valorando la producción de antígeno p24 y la viabilidad celular. Cada ensayo se realizó tres veces por duplicado.



**Efecto citopático de los cocultivos de los aislados BF (A) y RC (B) con la línea THP-1. A la derecha se muestra el control de células THP-1 sin infectar (C)**

**Figura 1**

La aparición de efecto citopático (ECP), formación de sincitios, sólo fue evidente en los cocultivos de los aislados BF y RC con la línea celular THP-1, como se muestra en la figura 1. Los cocultivos realizados con PBLs de donante sano, presentan en todos los aislados pequeños sincitios y agrupación de células que son características de células transformadas por HTLV. La aparición de estos sincitios se presenta aproximadamente al cabo de dos semanas de cultivo.

La viabilidad celular de los cocultivos desciende ligeramente en los primeros días para después estabilizarse entre un 80-90%. La viabilidad de las células tratadas con MMC, sin cocultivar, desciende rápidamente hasta llegar a niveles cercanos al 0% en los 4-5 días después del tratamiento. La detección de antígeno p24 desciende drásticamente en los cultivos tratados con MMC (figura 2).

## **1.2. Detección de antígeno p24 soluble**

Los resultados de la detección de antígeno p24 en los cocultivos a lo largo de 52 días de cultivo, son la media de los obtenidos en los tres ensayos realizados.

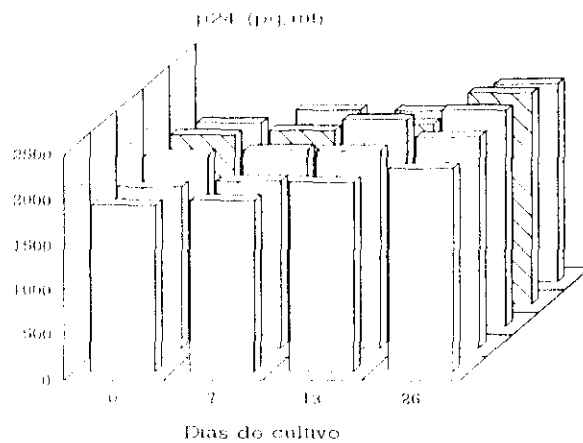
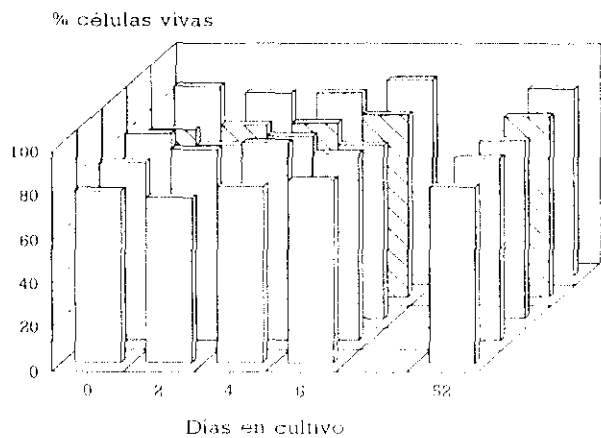
En la línea celular Raji, los cinco aislados se comportan muy similarmente. La p24 decae rápidamente, aunque en el cultivo con el aislado RC lo hace más lentamente. Al cabo de 52 días de cultivo presenta un nivel muy bajo de antígeno (40 pg/ml).

En las líneas linfoides T, HuT-78 y Molt-3, se observa prácticamente el mismo patrón de caída en la detección de antígeno. En los cultivos de los aislados RC y DP106 se detectan alrededor de 100 pg/ml en el día 13 de cultivo (en las dos líneas celulares), pero no se puede detectar antígeno en el día 26, al igual que en los demás aislados (figura 3a).

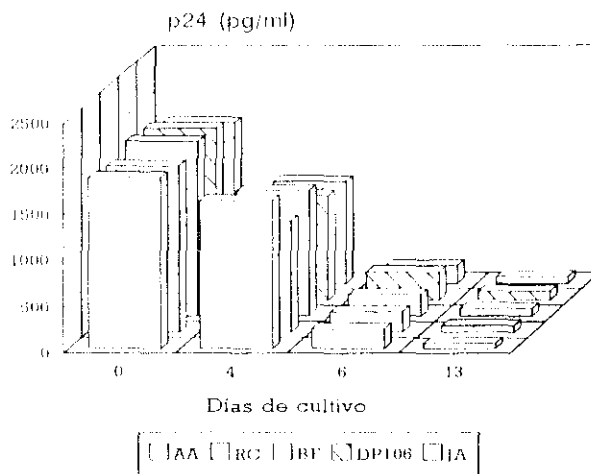
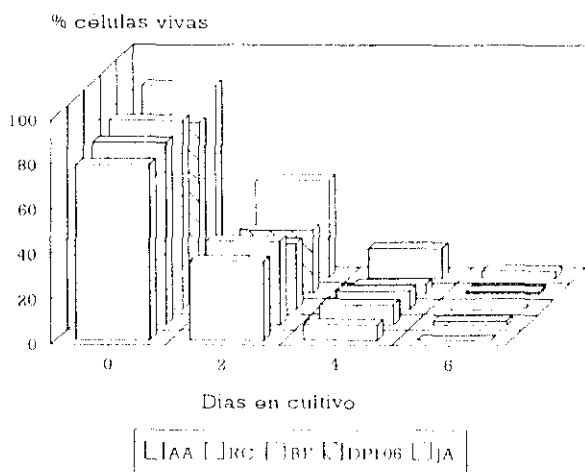
### Viabilidad celular

### Detección de antígeno

Sin mitomicina

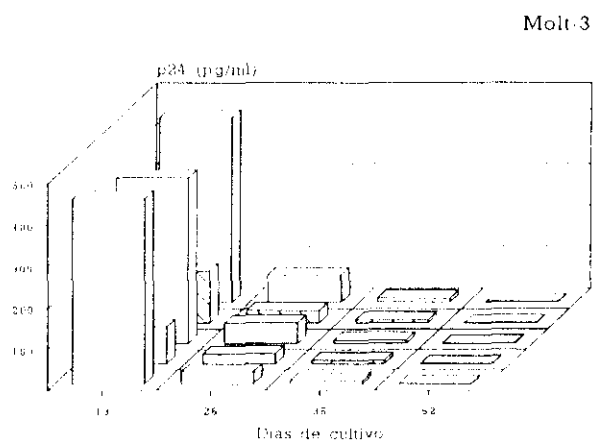
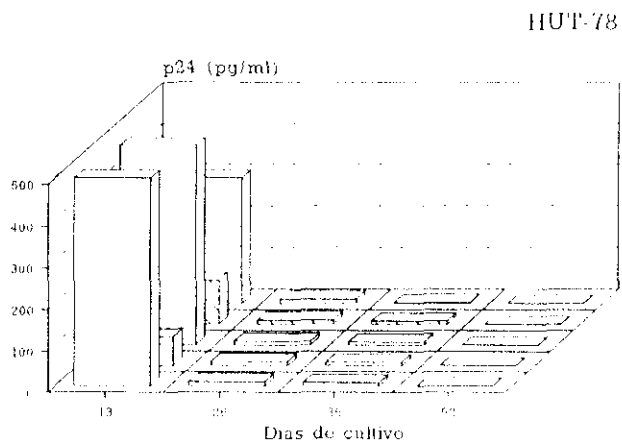
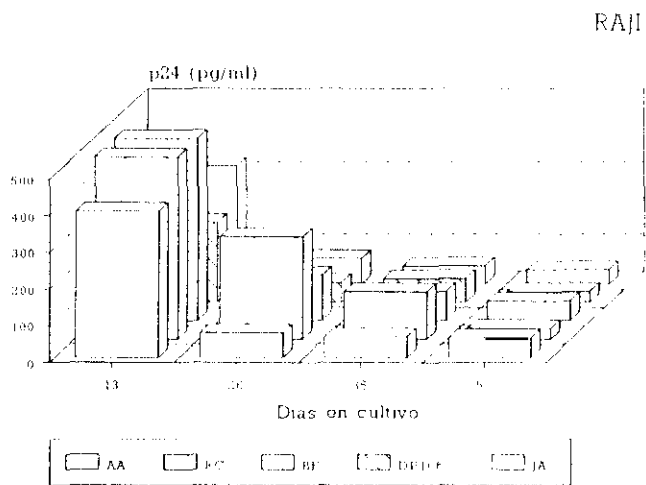


Con mitomicina



**Viabilidad celular y detección de antígeno p24 de las líneas celulares establecidas infectadas por HTLV-II**

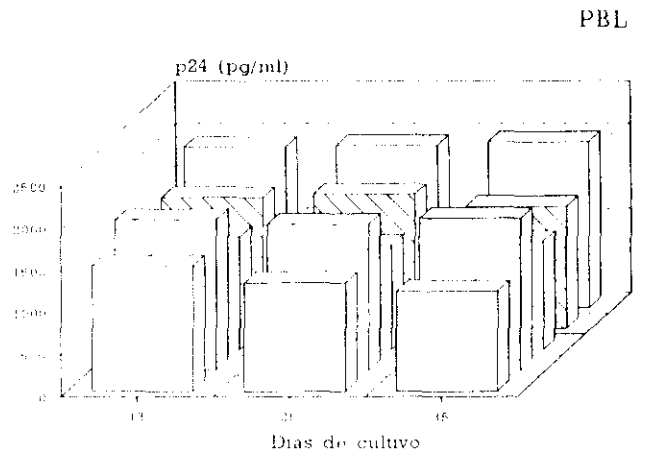
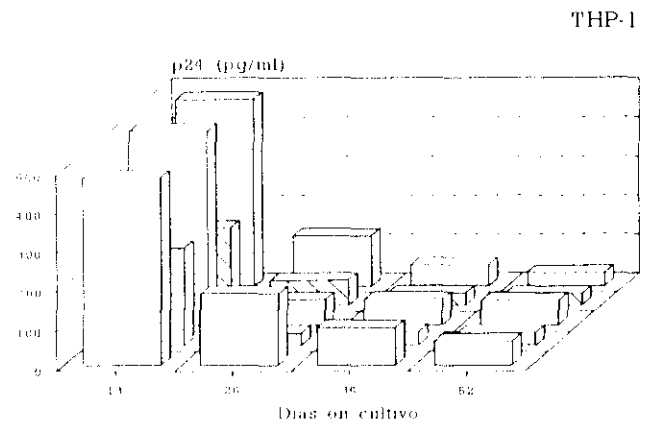
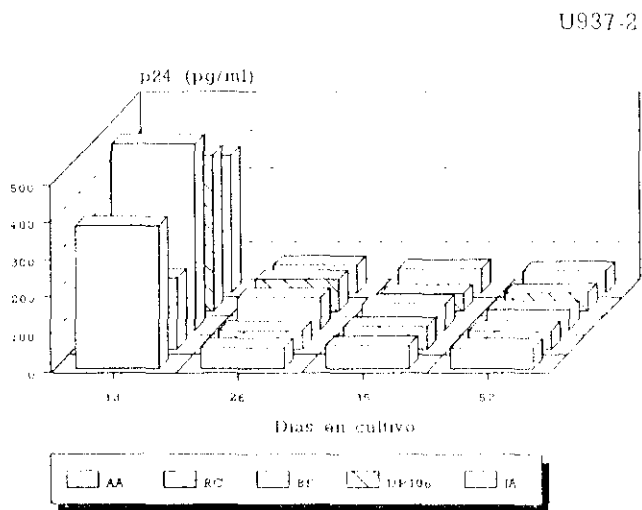
**Figura 2**



**Detección de antígeno p24 en los cocultivos de los cinco aislados (tratados con MMC) con las líneas celulares Raji, Hut-78 y Molt-3**

**Figura 3a**





**Detección de antígeno p24 en los cocultivos de los cinco aislados (tratados con MMC) con las líneas celulares U937-2, THP-1 y PBL**

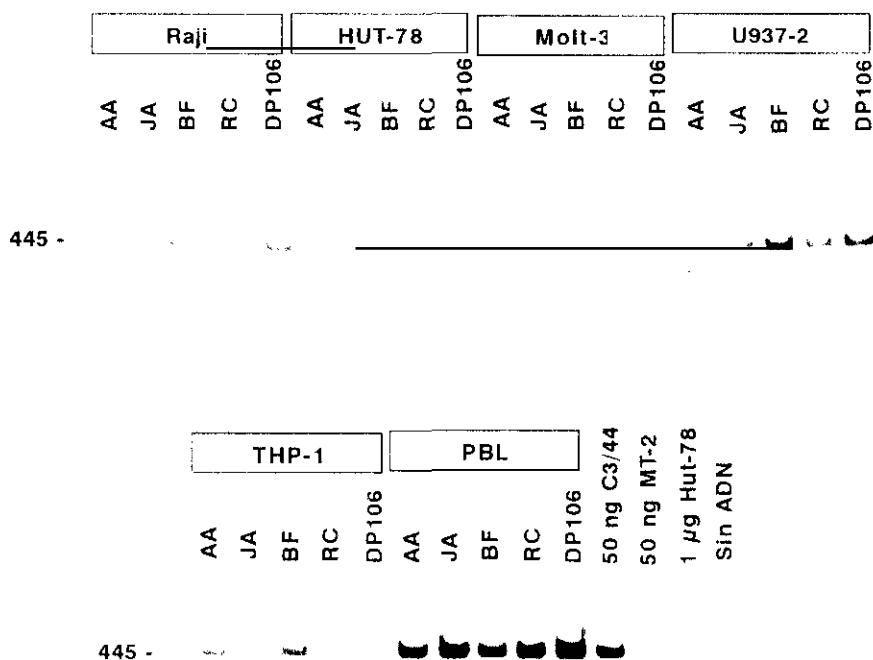
**Figura 3b**

En el sobrenadante de la línea monocíticas U937-2 de los distintos aislados se detecta una bajada progresiva de antígeno hasta el día 26. A partir de ese día la detección de antígeno se estabiliza en unos 50 pg/ml en todos los aislados. En la línea THP-1, el aislado AA presenta 200 pg/ml al día 26 de cultivo, quedándose en alrededor de 65 pg/ml en el día 52. El aislado BF se estabiliza en un nivel de 60 pg/ml hasta el día 52. El resto de los aislados decae muy por debajo de estos niveles (figura 3b).

La detección de antígeno en los cocultivos con PBLs es prácticamente constante durante la realización del ensayo, siendo alrededor de 2.000 pg/ml la cantidad de antígeno en cada cocultivo. Por el contrario, la detección de antígeno en los cultivos de los aislados tratados con MMC decae rápidamente, llegando a ser de alrededor de 15-20 pg/ml en el día 26.

### **1.3. Amplificación enzimática del ADN**

La detección de ADN específico se realizó por PCR en lisados de todos los cocultivos en el día 52. Se utilizaron para ello los oligonucleótidos 2x1/2x3, específicos para el gen tax/rex del HTLV-II. Los resultados de la hibridación de los productos de PCR, se muestran en la figura 4.

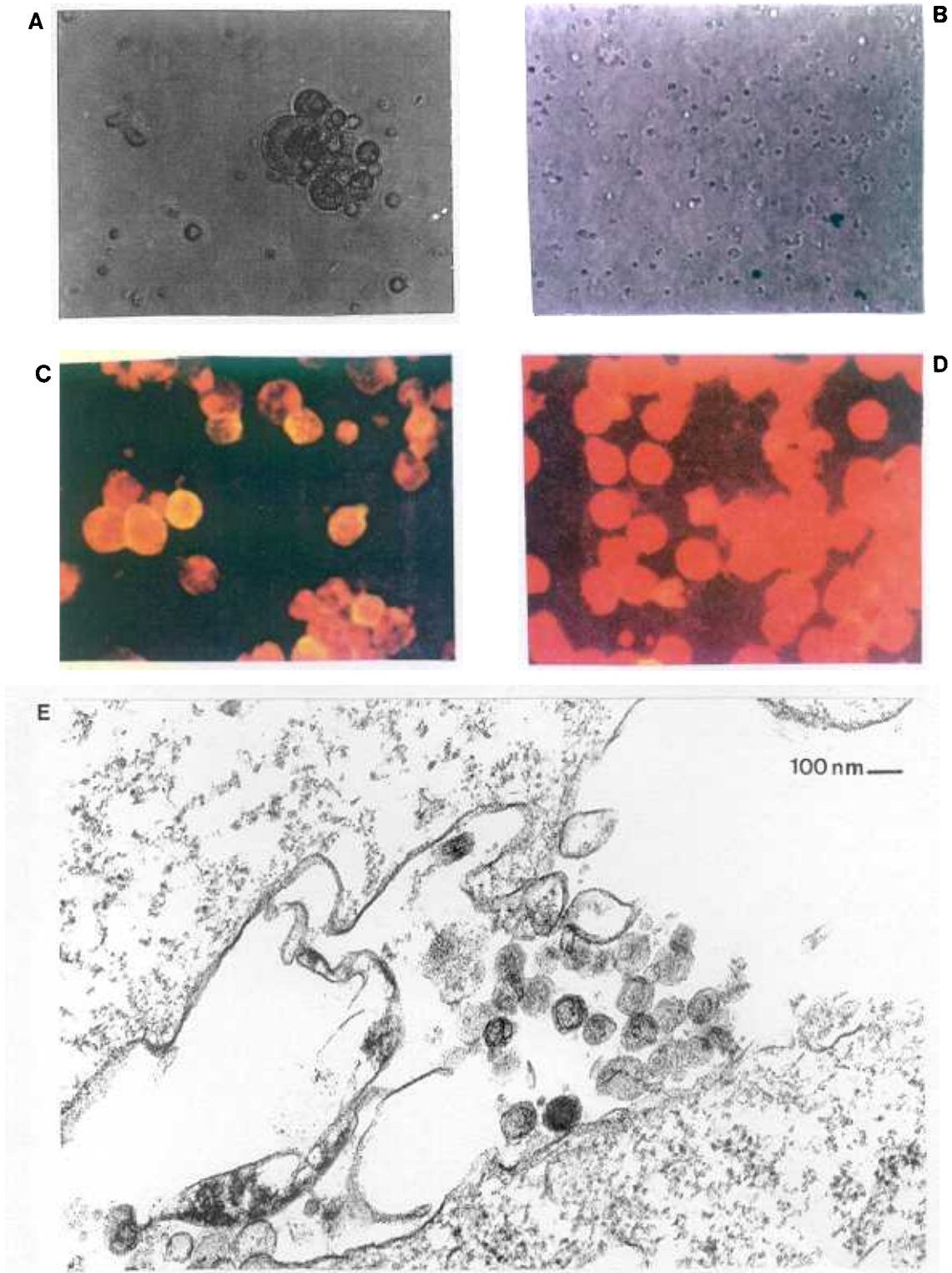


**Hibridación de los productos de PCR del gen tax/rex de HTLV-II de los cocultivos de los aislados con diferentes líneas celulares**

**Figura 4**

Los cinco aislados cocultivados con la línea celular Raji presentan amplificación específica (banda de 445 pb). En las líneas celulares HuT-78 y Molt-3, no se observa amplificación en ninguno de los aislados. En las líneas celulares monocíticas, U937-2 y THP-1, se detecta genoma específico en todos los aislados. En los cocultivos con PBLs se observa una alta amplificación en los mismos.

En la figura 5, se muestra el ECP causado por el aislado RC cuando se cultiva con PBL, y la inmunofluorescencia producida por el AcMo p19 HTLV en ese mismo aislado. Asimismo se muestra una micrografía electrónica de este cultivo, con partículas víricas. La preparación de la muestra y la realización de esta micrografía, se realizó gracias a la colaboración del Servicio de Microscopía Electrónica del CNBCR, ISCIII.



**Efecto citopático producido en PBL por el aislado de HTLV-II RC (A), al lado se muestra un cultivo de PBL sin infectar (B). Inmunofluorescencia del aislado RC cultivado con PBL utilizando un AcMo anti-p19 HTLV-I (C), y el control de PBL sin infectar (D). Micrografía electrónica mostrando partículas víricas del aislado RC (E)**

**Figura 5**

## 2. Secuenciación

### 2.1 Secuenciación a partir de células no cultivadas

Hemos secuenciado las regiones conservadas de pol y tax/rex del genoma del HTLV-II de los cinco aislados (AA, JA, RC1, BF, DP106). Utilizamos los oligonucleótidos 12P1/SK111 para amplificar el gen pol, y los oligonucleótidos 2x2/2x3 para el gen tax/rex. En algunos casos tuvimos que realizar hasta 45 ciclos de la primera PCR para obtener la cantidad de ADN necesaria para secuenciar. Para que los resultados fueran lo más fiables posibles realizamos cada secuencia dos veces, utilizando en una de ellas el primer 5' y en la otra el primer 3'. Además, cada secuencia se repitió dos veces, utilizando ADN procedente de dos PCR previas distintas.

Los cinco aislados presentaron la misma secuencia en pol y en tax/rex. Dicha secuencia se muestra en la figura 6.

Comparando la secuencia del gen pol de cada aislado con la secuencia correspondiente del prototipo de HTLV-II MoT (Shimotohno y cols., 1985), observamos 15 mutaciones (4.3%) en un total de 348 nucleótidos secuenciados. De esas 15 mutaciones, 14 fueron transiciones y 1 fue transversión (C-A en posición 4846). Tres mutaciones condujeron a un cambio en el aminoácido codificado (Arg-His en posición 4711, Val-Ile en posición 4780 e His-Asn en posición 4846), mientras que el resto de las mutaciones no produjeron ningún cambio.

Haciendo la misma comparación en el gen tax/rex (ORF-II) de los cinco aislados, observamos 2 mutaciones (0.49%) de 406 nucleótidos secuenciados. Estas mutaciones fueron transiciones y produjeron cambio en los aminoácidos codificados (Trp-Arg en posición 7230 y Thr-Ala en posición 7368).

De un total de 754 bases secuenciadas, observamos 17 mutaciones (2.25%) con respecto al aislado MoT.

## **2.2. Variabilidad *in vivo***

Del caso RC pudimos obtener tres muestras de sangre heparinizada con un intervalo de tiempo de aproximadamente cuatro meses entre ellas. El ADN de estas muestras fue extraído y secuenciado sin realizar cultivo celular. El resultado de dicha secuenciación es una secuencia idéntica entre ellas y a la obtenida del ADN del mismo caso pero de células cultivadas.

## **2.3. Variabilidad *in vitro***

Hemos secuenciado los cinco aislados de HTLV-II cultivados *in vitro* en PBLs de donantes. Los cultivos se mantuvieron durante seis meses realizándose el estudio de secuenciación al cabo de tres y seis meses de cultivo. El resultado de la secuenciación fue idéntico en los cinco casos, tanto cultivados tres como seis meses. Dicha secuencia es también idéntica a la obtenida del ADN procedente de células no cultivadas.

**A**

	4548									4662		
MoT	GCCTCCACGT CTGGGTAGAC ACCTTCTCCG GTGGGGTTTC CGTCTCCGTG AAAAAGAAAG AAACCAGCTG TGAGACTATC AGCCCCGGTTC TTCAGGCCAT JTCCCTCCTA GGGAAACCAC TCCACATTAA CACAGATAAT											
AA									C		T	
JA									C		T	
RC									C		T	
BF									C		T	
DP106									C		T	
			Arg							Val	4802	
MoT	GGGCCAGGTT TCCTATCAAA AGAATTCAG GAGTTTGGTA TCTCTATGG CATCAAGCAE TCTAG CCAAA TACTATACAA CTTTACTAGG TCAGCCCTGG TCGAGAGAAC CAATGGTGT ATCAAAAAC TACTAAATAA											
AA		T G		A	A				A G	A	T	C
JA		T G		A	A				A G	A	T	C
RC		T G		A	A				A G	A	T	C
BF		T G		A	A				A G	A	T	C
DP106		T G		A	A				A G	A	T	C
				His	His						Ile	
MoT	ATATCTAGT A GACTGEC TA ACCTTCAATC AGACAAATGC ATTCGAAAG CTTTGTGGAC TCTCAATCAG CTAATGTCA TGAACCCAG TGGTAAAACC CGATGGCAAAA TCCACCAC											
AA				A					C		C	
JA				A					C		C	
RC				A					C		C	
BF				A					C		C	
DP106				A					C		C	
				Asp							4896	

**B**

	7127										7245	
MoT	AGGGGGAGGC AACACAGATG TCAGACTGCG TCTCTCTGG TTTACTAAAG GAAATCTCT AAAATAGTTC AAAAAATCAC AATAATAC AATCTGTCT CCTCTPAGG CATTTCCAG GATTTGAAAGAA GAACTGCTA											
AA											C	
JA											C	
RC											C	
BF											C	
DP106											C	
											Arg	
MoT	TATGGAAATCTCTCTAAGCTTTTGGGAT TGTGTAAAGGCTGATGGCTTCCTGTCA GCTGGATAT GTRVACCG CTTATATGAA CATGCTTCT TGGTACTTG TCTAGAGCAC CAACCTAATTATGATCAAT											
AA											G	
JA											G	
RC											G	
BF											G	
DP106											G	
											Ala	7521
MoT	TAAATGAGGCTTGGTAACTCTCTCTCA AATACCTATATCTCAAGCTCTCTCTTCCCACTCAAGAGA ACTCAAGGA CTTCAAGHTCTTAACTTCAACTACTCTCTCTCC CAAGGTCTCACTTCTCTCT											
AA												
JA												
RC												
BF												
DP106												
	7553											
MoT	TTCAATCAAT GCGAAAGCAC ACCCC											
AA												
JA												
RC												
BF												
DP106												

Secuencia de los cinco aislados de HTLV-II españoles. **A.** 348 bases del gen pol. **B.** 406 bases del gen tax/ rex ORF-II. La secuencia del prototipo MoT se muestra en primer lugar. Se muestran los cambios de bases y los cambios de aas. Codones en cursiva.

**Figura 6**

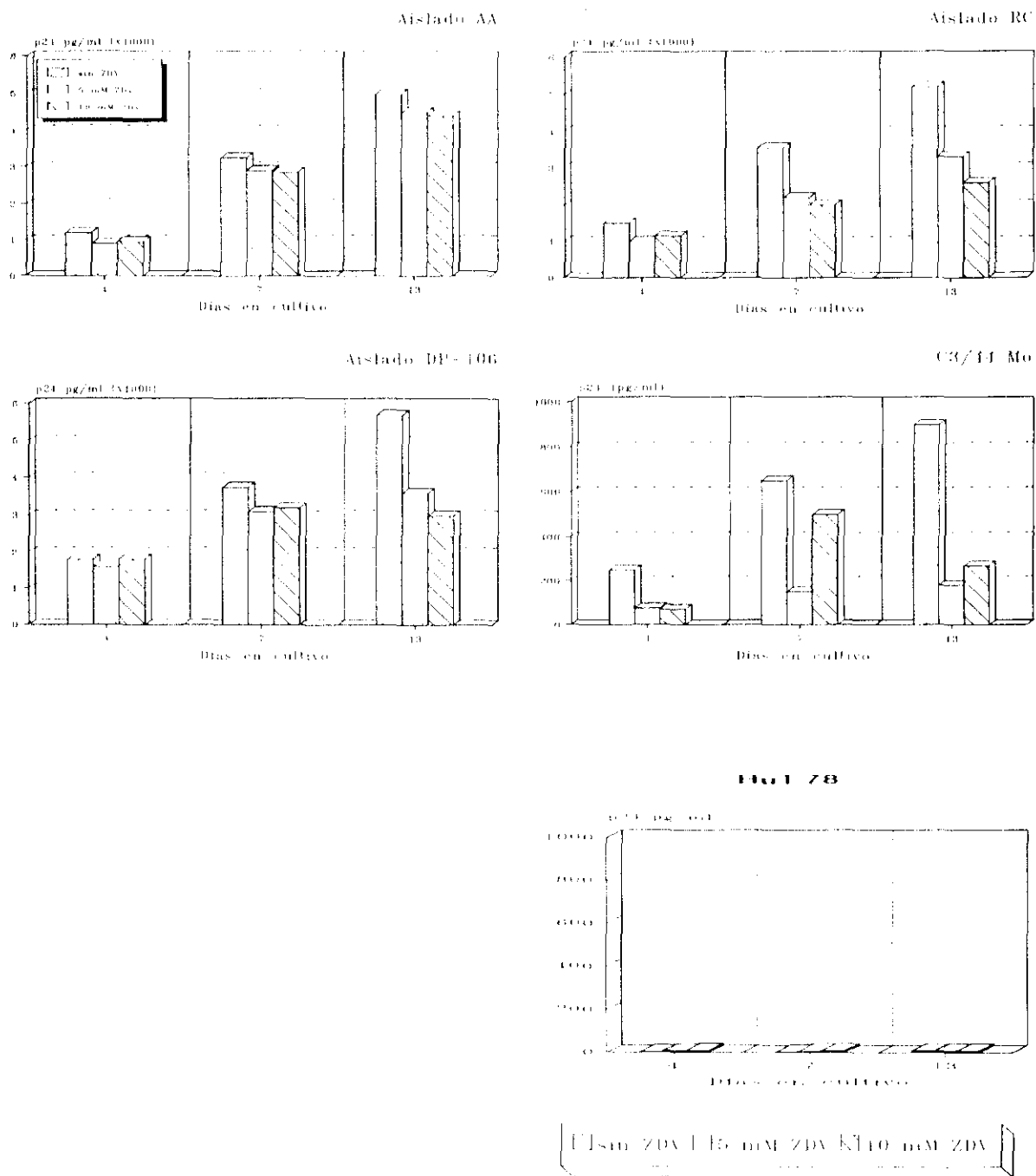
### **3. Estudio de sensibilidad a zidovudina (ZDV)**

Los aislados AA, RC y DP-106, así como la línea celular C3/44 (infectada por HTLV-II) fueron cultivados en ausencia y en presencia de 5 y 10 mM de zidovudina (ZDV). La valoración del efecto de este antivírico en la producción vírica se realizó mediante la detección del antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos (figura 7). La viabilidad celular de los cultivos fue controlada cada dos días para comprobar que el antivírico no resultaba tóxico (figura 8).

El ensayo se realizó una sóla vez por duplicado y los resultados mostrados son la media de éstos. La detección de antígeno se realizó al cabo de cuatro, siete y trece días del comienzo del cultivo. El aislado AA prácticamente no sufre ninguna variación en la detección de antígeno a lo largo de los 13 días de cultivo con ninguna de las concentraciones de antivírico utilizadas. Los aislados RC y DP-106 presentan una disminución de p24 en sobrenadante que llega hasta dos veces con la mayor concentración de antivírico y en el día 13 de cultivo. La viabilidad de estos cultivos no sufre variación significativa, manteniéndose alta (alrededor del 85%) durante todo el ensayo. La línea celular C3/44 Mo, infectada por HTLV-II, sufre una disminución de 3.4 veces (en las dos concentraciones de antivírico) en el día 4 de cultivo. Esta disminución llega a ser de hasta 5 veces en el día 13 y con 5 mM de antivírico. Hay que tener en cuenta que esta línea celular sufrió un descenso considerable en su viabilidad, llegando a sólo un 45% en los días 4 y 7 de cultivo. Sin embargo, en el día 13 la viabilidad aumentó hasta cerca del 65% en ambas concentraciones de antivírico.



## Detección de antígeno p24

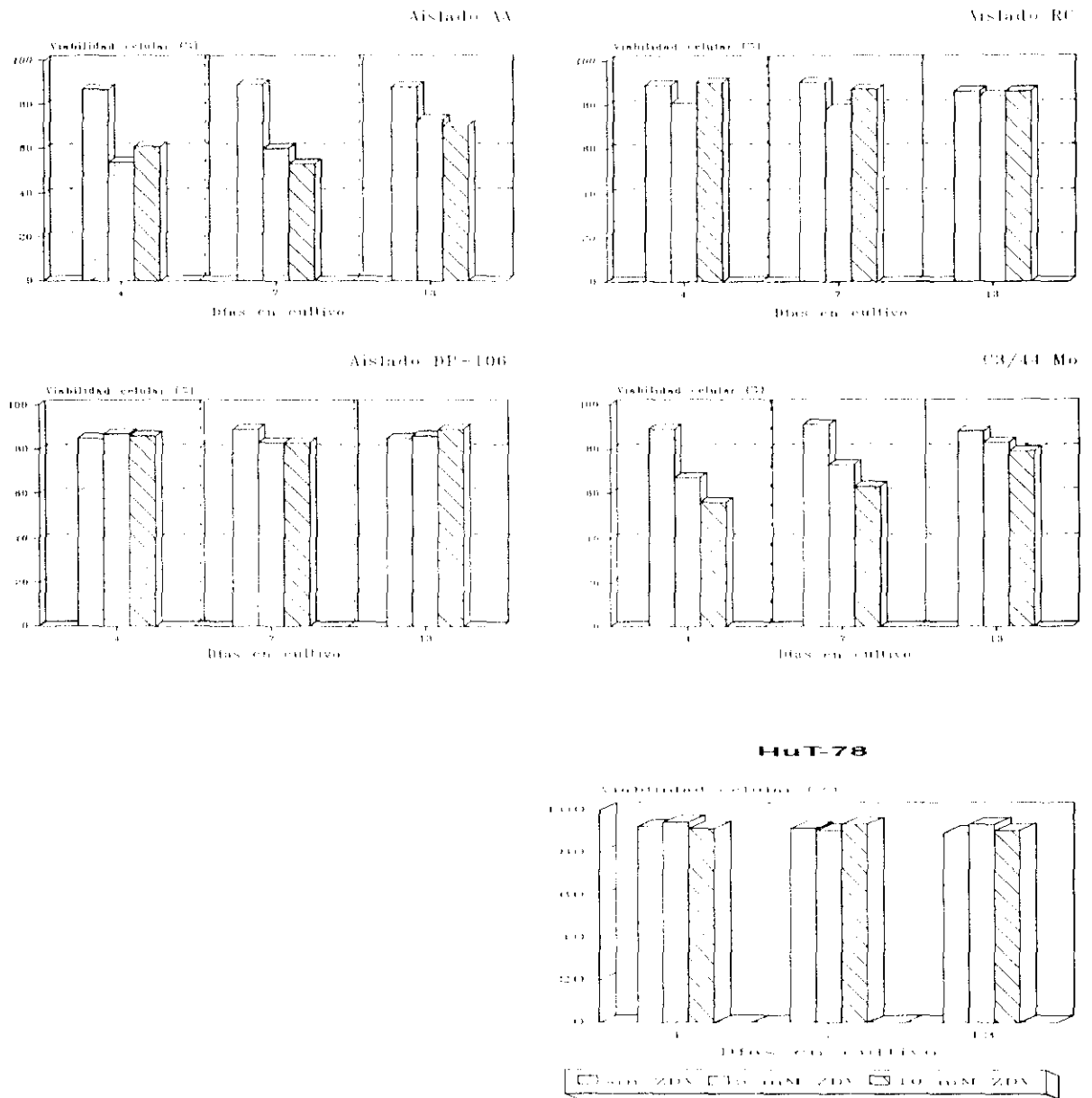


Detección de antígeno p24 soluble en cultivos de los aislados AA, RC, DP-106, en la línea celular C3/44 Mo y en Hut-78

## Sensibilidad a zidovudina de los aislados de HTLV-II

Figura 7

## Viabilidad celular



**Viabilidad celular de los aislados de HTLV-II**

**Figura 8**

## DISCUSSION III

Con la realización de los previos estudios de diagnóstico de la infección por HTLV-I/II, hemos podido cultivar y aislar cinco HTLV-II de casos españoles. Hasta ahora, según nuestros conocimientos, es la primera vez que se aísla este retrovirus en España, debido posiblemente a la baja incidencia de los virus linfotrópicos (HTLVs) en nuestro país. A esto hay que añadir que el aislamiento de cualquier retrovirus es un proceso largo y costoso, con lo que pocos laboratorios pueden dedicarse a ello.

Con estos cinco aislados (AA, JA, RC1, BF y DP106) quisimos llevar a cabo los estudios de caracterización con el fin de conocer mejor la biología y la composición genética de estos retrovirus. Para ello, se realizó 1) una caracterización fenotípica mediante infección en líneas celulares establecidas de distintos linajes, 2) un análisis de la secuencia nucleotídica de los aislados, tanto *in vivo* como cultivados *in vitro*, y realizamos un estudio de variabilidad *in vivo* de uno de los aislados con un intervalo de aproximadamente nueve meses, y 3) se ha realizado un estudio preliminar de sensibilidad al antivírico ZDV (zidovudina o azidotimidina, AZT), con el fin de comprobar su eficacia en impedir la replicación vírica (como ocurre con el retrovirus VIII).

## 1. Caracterización fenotípica

Como ya se ha dicho anteriormente, estos retrovirus son muy poco o nada infectivos como partículas libres de células, es decir, tienen que estar asociados a células para poder ser infectivos. Las cinco líneas establecidas en PBLs de los cinco aislados se sometieron, por tanto, a cocultivo con líneas celulares de diferentes linajes. Al tener que utilizar células infectadas, tuvimos que impedir el crecimiento de éstas para, de esa manera, estar seguros de que si al final del

ensayo existe replicación vírica, ésta sea debida a la infección de la nueva línea celular y no por el simple crecimiento de las células originales. La manera elegida para impedir la replicación celular de las líneas infectadas fue el tratamiento con mitomicina-C (MMC), un bloqueador de la formación de huso acromático que detiene la división celular e impide la mitosis.

Se eligieron líneas linfocíticas T, Hut-78 y Molt-3, linfocíticas B, Raji y monocíticas, U-937-2 y THP-1, como células diana para la infección. Asimismo, utilizamos PBLs no infectados para comprobar que la infectividad de los aislados no se pierde tras el tratamiento con MMC.

Durante los 52 días del ensayo, se observó la aparición de ECP en la línea celular THP-1, en cocultivo con los aislados BF y RC, así como en los cocultivos con PBLs de los cinco aislados. El resto de los cocultivos no presentó ninguna característica morfológica distintiva.

Los resultados obtenidos en los cinco cocultivos con PBL de donante sano, pone de manifiesto que la infectividad de las células infectadas tratadas con mitomicina no se pierde, por tanto, este tratamiento no impide la infección a otras células pero sí impide su replicación celular. Sin embargo, los resultados obtenidos con las otras líneas celulares no son tan evidentes. En general, la p24 decae, en unos casos más rápidamente que en otros, progresivamente, salvo en la línea U-937-2 donde todos los aislados se estabilizan en aproximadamente 50 pg/ml en los últimos días del ensayo, y en la línea THP-1 donde los aislados AA y BF se estabilizan en unos 60-65 pg/ml. En la línea celular RAJI solo se llega a niveles de unos 40 pg/ml en el día 52 del estudio. Como la detección de antígeno en las distintas líneas celulares no es muy elevada, quisimos comprobar si hubo infección pero que el virus no se replicaba por alguna razón. Para ello, quisimos detectar la presencia de ácido nucleico (ADN) mediante PCR en el día 52 de todos los cocultivos realizados. Por otra parte, sabemos que en el día 52, el cultivo de los aislados tratados con MMC, solo presenta algunos restos de células (en ningún

caso células enteras y viables) y ni mucho menos se detectan rastros de antígeno p24 en el sobrenadante, con lo cual es casi imposible obtener una señal positiva por PCR de estos cultivos, ya que los posibles restos de ADN podrían estar completamente degradados.

Amplificamos por PCR-simple la región tax/rex (HTLV-II), que incluye los genes relacionados con la regulación de la replicación vírica. El resultado fue negativo en las líneas Hut-78 y Molt-3 en los cinco aislados y positivo en las restantes líneas. Esto indica que hay presencia de provirus en las líneas linfocíticas B y monocíticas, y no en las líneas linfocíticas T. Es posible que, como mencionamos antes, se hayan infectado tales líneas, pero que la replicación vírica se vea de alguna manera reprimida por algún factor celular o que al producirse la infección se hayan producido genomas defectivos que impidan la replicación vírica, puesto que no detectamos la región genómica fundamental en la regulación de tal replicación. Hay que destacar la escasa bibliografía referente a estos ensayos fenotípicos en los HTLV, siendo aún más escasa en lo referente a HTLV-II.

## 2. Secuenciación

El aislado original de HTLV-II (MoT) ha sido extensamente caracterizado y su genoma completo ha sido secuenciado. Hemos comparado las secuencias de los cinco aislados españoles con la del prototipo MoT (figura 1).

En el gen pol (nucleótidos 4548-4896, sin incluir la secuencia de los nucleótidos), hemos detectado 15 mutaciones de 348 bases secuenciadas que representan un 4.3% de variación con respecto a MoT. Una de estas mutaciones fue una transversión (C → A, 4846), mientras que el resto transiciones. Tres de estas mutaciones originan un cambio en el aminoácido codificado, Arg → His, Val

→ Ile, His → Asn (4711, 4780 y 4846, respectivamente; posiciones del primer nucleótido del codon).

En el gen tax/rex se han detectado 2 mutaciones de 406 bases secuenciadas, representando un 0.49% de diferencia con respecto a MoT. Las dos fueron transiciones y producen sendos cambios de aminoácidos (tax/rex ORF-II), Trp → Arg, Thr → Ala (7230 y 7368, respectivamente).

Gen pol								
Posición	4623	4653	4675	4677	4712	4719	4731	4767
MoT	T	C	C	A	G (Arg)	G	T	G
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Aislados	C	T	T	G	A (His)	A	C	A

Posición	4770	4780	4791	4800	4846	4857	4863
MoT	A	G (Val)	C	T	C (His)	T	T
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Aislados	G	A (Ile)	T	C	A (Asn)	C	C

Gen tax/rex		
Posición	7230	7368
MoT	T (Trp)	A (Thr)
	↓	↓
Aislados	C (Arg)	G (Ala)

Posición de los cambios de nucleótidos de los aislados de HTLV-II comparado con la secuencia del prototipo MoT. Los cambios de aminoácidos se presentan entre paréntesis.

Figura 1

Tomando estos datos en conjunto, podemos decir que hemos detectado 17 mutaciones en 754 bases secuenciadas, lo que representa una variación con respecto a MoT de 2.25%.

En nuestro estudio quisimos secuenciar zonas ya estudiadas por otros autores, con el fin de hacer un estudio comparativo. Dube y cols. (1993), tienen un trabajo de secuenciación de varias cepas de HTLV-II procedentes de distintos individuos del Continente Americano, incluyendo a Indios Tobas (Argentina), Guaymis (Panamá) y Seminolas (Florida). Por otra parte, Hall y cols. (1992) comunicaron una clara heterogeneidad entre ocho diferentes aislados de HTLV-II de Norte América, demostrando dos patrones de mapas de restricción bien diferenciados en el gen env. Ellos sugirieron que al menos existen dos subtipos de HTLV-II. Los datos de Dube y cols., concuerdan con esta idea y así relacionan las secuencias de RC23723, RA15893, Seminolas, Tobas y Guaymis con un grupo de virus denominado **subtipo B**, mientras que el resto de las variantes de HTLV-II, incluido el prototipo MoT, podrían ser clasificadas como **subtipo A**.

Nuestros datos de secuencia del gen pol, nucleótidos 4757-4896, que son los secuenciados por el grupo de Dube, presentan un patrón muy similar al presentado por los aislados del **subtipo B**. En la figura 2, comparamos la secuencia de los aislados españoles con algunos aislados de HTLV-II secuenciados por Dube y cols. La comparación de uno de esos aislados de HTLV-II (RC23723) con los HTLV-II españoles en el gen tax/rex, confirmaría el patrón de subtipo B de éstos, al coincidir la mutación en posición 7368 (A → G). Es interesante decir que esta *misma mutación se ha observado en aislados de HTLV-II de Indios Seminolas y Guaymis* (Nishimura y cols., no publicado, citado en el trabajo de Dube y cols., 1993). La mutación que encontramos en posición 7230 no se pudo comparar porque secuencian a partir de la posición 7267.



### A

	157																488				
MoT		GGTCTGCTTGAATGGACCACTAAGGTTGTAATCAAAAACCTTACTAAATAAATATCTACTAGACTGGCTTAACTTCTCTTATGTAATGGCAATTCACAAAGCCCTTTGGACTCTCAATCAGCTCAATTCATGAACATCCAGTGGT																			
Aislado		A	G	A	T	C											A	C	C		
Seminole		A		A	T	C											A	C	C		
Osage		A	G	A	T	C											A		C		
Texas		A	G	A	T	C											A	C	C		
RA15895		A	G	A	T	C											A		C		
RC23723		C	A	G	A	C											A		C		

### B

	72																128				
MoT		TTGAGCAATGTTCTGACAGGCTGATGGGCTGCAAGGTTGAGGAGGTTAAGTTATACCGTCTACTACATGCAATGCTGATGGCCAGCTGTGACAGGATCAAACTCACCTTGGTACCCAT																			
Aislado																					G
RC23723																					G

Secuencia de los aislados comparada con la del prototipo MoT y con algunos aislados, secuenciados por otros autores, de HTLV-II de indios de distintas regiones. A. Secuencia de 348 bases del gen pol. B. Secuencia del gen pX ORF-II (sólo se muestran 159 de 406 bases secuenciadas). Se muestran los cambios de bases

**Figura 1**

### 3. Sensibilidad a zidovudina

La zidovudina (ZDV; o azidotimidina, AZT) es un análogo de nucleósido que actúa a nivel de la transcriptasa inversa, impidiendo la replicación vírica. Al tener un grupo azida en 3', una vez incorporado a la cadena de ADN, en el proceso de transcripción inversa, impide que un nuevo nucleósido se una en 3', bloqueando así la elongación de la cadena de ADN.

Con este ensayo hemos intentado conocer si realmente el ZDV actúa sobre los aislados de HTLV-II, como ocurre con los retrovirus VIH y HTLV-I, hecho descrito extensamente en el caso del VIH y muy poco en HTLV-I (Matsushita y cols., 1987). El bajo número de trabajos de sensibilidad a este tipo de antivírico realizados en HTLV-I, indican que el ZDV impide eficazmente la replicación vírica *in vitro*, no obstante, estudios realizados *in vivo* no han ofrecido ningún resultado positivo a este respecto. Si los trabajos en HTLV-I son escasos, los de HTLV-II lo son mucho más, de hecho no hemos encontrado ningún trabajo que contemple este tipo de ensayos *in vitro*.

Sólo pudimos realizar el ensayo con los aislados AA, RC y DP-106. También realizamos el ensayo con una línea celular infectada por HTLV-II, C3/44 Mo. Los resultados obtenidos hay que examinarlos teniendo en cuenta que sólo se ha realizado una vez por duplicado. La imposibilidad de realizar el ensayo varias veces con el fin de comprobar su repetibilidad, nos obliga a considerar este ensayo como un primer acercamiento - sin confirmación - al problema de la sensibilidad a antivíricos de los HTLV-II. De cualquier manera, se decidió incluirlo con el propósito de que sirviera como antecedente en un posible estudio futuro.

# **CONCLUSIONES**

---

1. En el estudio de la población africana (Guinea Ecuatorial), hemos detectado una prevalencia de la infección por HTLV, en población general, de 0.7%. Hay que destacar la presencia de infección por HTLV-II en estos sueros, ya que es una zona endémica de HTLV-I, aunque algunos autores recientemente han descrito la presencia de HTLV-II en determinadas zonas de Africa.

2. Hemos podido demostrar una prevalencia en el estudio de población general de Portugal de 16/100.000, y debida a infección por HTLV-I.

3. Los resultados de infección por HTLV entre donantes de sangre en España, no nos ha permitido detectar la presencia de HTLV en una muestra de cerca de 22.000 donantes. De este estudio, podemos deducir que la prevalencia es posiblemente igual o menor de 4/100.000, mucho menor que la detectada en Portugal (16/100.000) y posiblemente muy similar a la descrita en estudios realizados en Francia (4.3/100.000), países limítrofes al nuestro. Esto indica la necesidad de seguir realizando estudios de prevalencia con una muestra mayor, así como valorar la posible necesidad de la aplicación rutinaria de técnicas de detección de anticuerpos en los Bancos de Sangre españoles, como ocurre en Estados Unidos y Francia.

4. Hemos podido detectar una prevalencia de la infección por HTLV entre población con prácticas de riesgo (ADVP) en España, de alrededor del 1% (1/149). Esta prevalencia es mucho menor a la descrita en Italia donde alcanza un 5%. Además, la infección detectada en España fue debida a HTLV-II, hecho que está de acuerdo con el conocimiento general de que la infección por HTLV entre individuos con esta práctica de riesgo, es mayoritariamente debida a HTLV-II.

5. En las muestras analizadas procedentes de *Micosis fungoide*, no hemos podido detectar la presencia de HTLV-I/II, lo que podría apoyar que la relación entre estos retrovirus y este tipo de patología, no está todavía bien establecida.

6. El estudio realizado en una pareja, nos ha permitido describir una posible transmisión sexual del HTLV-II, vía de transmisión no bien descrita hasta 1992.

7. Hemos podido aislar cinco HTLV-II españoles, cuyas características fenotípicas muestran una cierta capacidad de infección en líneas celulares linfocíticas B y monocíticas, aunque la replicación en éstas no ha sido muy evidente. Sin embargo, la infección y replicación víricas han sido muy altas en linfocitos de sangre periférica. También hemos podido aproximarnos al estudio de la sensibilidad al antivírico zidovudina, apreciando una significativa reducción en la replicación vírica de alguno de los aislados.

8. Las características genotípicas de estos aislados, reflejadas en un estudio de secuenciación en dos regiones de su genoma, nos muestran que presentan una secuencia idéntica entre ellos y con una divergencia del 2.25% con respecto al prototipo de HTLV-II, MoT. El análisis de la secuencia de estos aislados nos ha permitido clasificarlos dentro del subtipo B de los HTLV-II.

9. El estudio de variabilidad genética, tanto *in vivo* (en un sólo aislado) como *in vitro*, está de acuerdo con la idea de la poca o nula variabilidad de estos retrovirus, al no haber detectado ninguna mutación en tres muestras consecutivas de un aislado, ni en los cultivos *in vitro* realizados durante seis meses en todos ellos.

10. El desarrollo de este trabajo nos ha permitido el aislamiento de los primeros HTLV-II españoles y su caracterización molecular.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- Abbott, M.A., B.J. Poiesz, B.C. Byrne, S. Kwok, J.J. Sninsky, and G.D. Ehrlich.** 1988. Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. *J. Infect. Dis.* **158**:1158-69.
- Aboud, M., M. Rosner, A. Dombrovsky, T. Revazova, G. Feldman, L. Tolpolar, Y. Strilitzhassan, R.M. Flugel.** 1992. Interactions between retroviruses and environmental carcinogens and their role in animal and human leukemogenesis. *Leukemia Research* **16**:1061-1069.
- Adachi, Y., T. Nosaka, and M. Hatanaka.** 1990. Protein kinase inhibitor H-7 blocks accumulation of unspliced mRNA human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:469-75.
- Ando, Y., S. Nakano, K. Saito, I. Shimamoto, M. Ichijo, T. Toyama, and Y. Hinuma.** 1987. Transmission of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I) from mother to child: comparison of bottle- with breast-fed babies. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**:322-4.
- Ando, Y., K. Kakimoto, T. Tanigawa, K. Furuki, K. Saito, S. Nakano, H. Hashimoto, I. Moriyama, M. Ichijo, and T. Toyama.** 1989. Effect of freeze-thawing breast milk on vertical HTLV-I transmission from seropositive mothers to children. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**:405-7.
- Asher, D.M., J. Goudsmit, K.L. Pomeroy, R.M. Garruto, M. Bakker, S.G. Ono, N. Elliott, K. Harris, H. Askins, Z. Eldadah, A.D. Goldstein, and D.C. Gajdusek.** 1988. Antibodies to HTLV I in populations of the southwestern Pacific. *J. Med. Virol.* **26**:339-351.
- Babona, D.V., and G.T. Nurse.** 1988. HTLV-I antibodies in Papua New Guinea. *Lancet* **2**:1148.
- Baltimore, D.** 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature* **226**:1211-3.
- Barré-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, et al.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-70.
- Bastian, I., J. Gardner, D. Webb, and I. Gardner.** 1993. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *J. Virol.* **67**:843-851.
- Bednarik, D.P., J.D. Mosca, and N.B.K. Raj.** 1987. Methylation as a modulator of expression of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **61**:1253-7.
- Black, A.C., C.T. Ruland, M.T. Yip, J. Luo, B. Tran, A. Kalsi, E. Quan, M. Aboud, I.S. Chen, and J.D. Rosenblatt.** 1991. Human T-cell leukemia virus type II rex binding and activity require an intact splice donor site and a specific RNA secondary structure. *J. Virol.* **65**:6645-53.
- Blattner, W.A., D.W. Blayney, M. Robert-Guiroff, V.S. Kalyanaraman, and R.C. Gallo.** 1983. Epidemiology of human T-cell leukemia/lymphoma virus. *J. Infect. Dis.* **147**:406-16.
- Bohnelein, S., F.P. Pirker, L. Hofer, K. Zimmerman, H. Bachmayer, E. Bohnelein, and J. Hauber.** 1991. Transdominant repressors for human T cell leukemia virus type I rex and human immunodeficiency virus type I rev function. *J. Virol.* **65**:81-8.
- Cartier, L., F. Araya, R. Verdugo.** 1988. Paraparesia espástica progresiva asociada a HTLV-I en Chile. *Rev. Chil. Neuropsiquiat.* **26**:R3.20.
- Centers for Disease Control.** 1988. Licensure of screening test for human T-lymphotropic virus type I. *MMWR* **37**:736-40,745-7.

- Chen, Y.M.A., T.H. Lee, S.Z. Wiktor, G.M. Shaw, E.L. Murphy, W.A. Blattner, and M. Essex. 1990. Type-specific antigens for serological discrimination of HTLV-I and HTLV-II infection. *Lancet* **336**:1153-5.
- Chen, Y.M.A., A. Okayama, T.H. Lee, N. Tachibana, N. Mueller, and M. Essex. 1991. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with the presence of anti-tax antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1181-6.
- Cilla, G., F. Otero, A. Carcedo, I. Ausin, C. Gutierrez y E. Pérez-Trallero. 1993. Prevalencia de infección por HTLV-I y II en ADVP en Guipuzcoa. *II Congreso Nacional sobre el SIDA*: B-29: Bilbao.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-6.
- Constantine, N.T., M.F. Sheba, A.L. Corwin, et al. 1991. A Serosurvey for HTLV-I Among High-Risk Populations and Normal Adults in Egypt. *Epidemiology and Infection* **107**:429-33.
- Cossen, C., S. Hagens, R. Fukuchi, B. Forghani, D. Gallo, and M. Ascher. 1992. Comparison of six commercial human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) enzyme immunoassay kits for detection of antibody to HTLV-I and -II. *J. Clin. Microbiol.* **724**-5.
- Daenke, S., S. Nightingale, J.K. Cruickshank, and C.R. Bangham. 1990. Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. *J. Virol.* **64**:1278-82.
- De, B.K., M.D. Lairmore, K. Griffis, L.J. Williams, F. Villinger, T.M. Quinn, C. Brown, M. Nzilambi, S. Sugimoto, S. Araki, and T.M. Folks. 1991. Comparative analysis of nucleotide sequences of the partial envelope gene (5' domain) among human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) isolates. *Virology* **182**:413-419.
- De Montalembert, M., E. Wattel, F. Lefrere, M. Mariotti, F. Agis, F. Ferrer le Coeur, R. Giroit, and J.J. Lefrere. 1993. Human T-cell lymphotropic virus type I and II DNA amplification in seropositive and seronegative at-risk individuals. *Transfusion* **33**:106-110.
- De Rossi, A., O.D. Gassa, A. Del Mistro, et al. 1986. HTLV-III and HTLV-I infection in population at risk in the Veneto region of Italy. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **22**:411-8.
- De Rossi, A., F. Mammamo, A. Del Mistro, and L. Chicco-Bianchi. 1991. Serological and molecular evidence of infection by human T-cell lymphotropic virus type II in italian drug addicts by use of synthetic peptides and polimerase chain reaction. *Eur. J. Cancer* **27**:835-8.
- Dekaban, G.A., E.E. King, D. Waters, and G.P.A. Rice. 1992. Nucleotide sequence analysis of an HTLV-I isolate from a chilean patient with HAM/TSP. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1201-1207.
- Delaporte, E., N. Monplaisir, J. Louwagie, N. Peeters, Y. Martin-Prevel, J.P. Louis, A. Trebucq, L. Bedjabaga, S. Ossari, C. Honore, et al. 1991. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II Infection in Gabon, Africa-Comparison of the Serological and PCR Results. *Int. J. Cancer* **49**:373-6.
- Delaporte, E., J. Louwagie, M. Peeters, N. Montplaisir, L. d'Auriol, Y. Ville, L. Bedjabaga, B. Larouze, G. Van der Groen, and P. Piot. 1991. Evidence of HTLV-II infection in Central Africa. *AIDS* **5**:771-772.
- D'Onofrio, C., C.D. Pesce, T. Fontana, F. Ciprani, E. Bonmassar and R. Calio. 1990. Modulation of the cell-mediated immune function by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$  can partially reverse the immunosuppression induced by human T-cell leukemia virus I in human cord blood cultures. *Cancer Immunol. Immunother.* **31**:213-20.
- D'Onofrio, C., O. Franzese, A. Puglianiello, E. Peci, G. Lanzilli, and E. Bonmassar. 1992. Antiviral activity of individual versus combined treatments with interferon alpha, beta and gamma on early infection with HTLV-I in vitro. *Int. J. Immunopharmacology* **14**:1069-79.



- Dube, D.K., M.P. Sherman, N.K. Saxena, V. Bryz-Gornia, J. Mendelson, J. Love, C.B. Arnold, T. Spicer, S. Dube, J.B. Glaser, A.E. Williams, M. Nishimura, S. Jacobsen, J.F. Ferrer, N. del Pino, S. Quiruelas, and B.J. Poiesz. 1993. Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/lymphoma virus type II. *J. Virol.* **67**:1175-1184.
- Duc Dodon, M., and L. Gazzolo. 1987. Loss of interleukin 2 requirement for the generation of T-cell colonies defines an early event of human T-lymphotropic virus infection. *Blood* **69**:12-7.
- Dueñas-Barajas, E., J.E. Bernal, D.R. Vaught, I. Briceño, C. Durán, R. Yanagihara, and D.C. Gajdusek. 1992. Coexistence of human T-lymphotropic virus type I and II among the Wayuu Indians from the Guajira Region of Colombia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1851-1855.
- Duggan, D.B., G.D. Ehrlich, F.P. Darvey, S. Kwok, J. Sninsky, J. Goldberg, L. Baltrucki, and B.J. Poiesz. 1988. HTLV-I induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease: diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA. *Blood* **71**:1027-32.
- Dumas, M., D. Houinato, M. Verdier, T. Zohoun, R. Josse, J. Bonis, I. Zohoun, A. Massoughodji, and F. Denis. 1991. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**:447-51.
- Ehrlich, G.D., J.B. Glaser, K. LaVigne, D. Quan, D. Mildvan, J.J. Sninsky, S. Kwok, L. Papsidero, and B.J. Poiesz. 1989. Prevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) type II infection among high-risk individuals: type-specific identification of HTLV's by polymerase chain reaction. *Blood* **74**:1658-64.
- Ehrlich, G.D., J. Andrews, M.R. Sherman, S.G. Greenberg, and B.J. Poiesz. 1992. DNA sequence analysis of the gene encoding the HTLV-I p21E transmembrane protein reveals inter- and intrasolate genetic heterogeneity. *Virology* **186**:619-27.
- Ellerman, V., and O. Bang. 1908. Experimentelle leukämie bei hülmem. *Centralbl. Bakteriol.* **46**:595-605.
- Estébanez, P., R. Nájera, N. Rua-Figueroa, et al. 1991. Prevalence HIV, HTLV-I, HIV2, syphilis, hepatitis B in Spain female sex-workers. *VII International Conference on AIDS*. Abstract book, vol. **2**. Florence.
- Fan, N., J. Gavalchín, B. Paul, K.H. Wells, M.J. Lane, and B.J. Poiesz. 1992. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J. Clin. Microbiology* **30**:905-910.
- Faller, D.V., M.A.V. Crommins, and S.J. Mantzer. 1988. Human T-cell leukemia virus type I infection of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clones results in immortalization with retention of antigen specificity. *J. Virol.* **62**:2942-50.
- Farouqi, B., M. Yahyaoui, F.M. Alaoui, N. Noraz, S. Sekkat, T. Chkili, C. Desgranges, and A. Benslimane. 1992. Establishment of T-lymphoid cell lines from morroccan patients with tropical spastic paraparesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1209-1213.
- Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.L. Knudson, et al (eds). 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. supp* **2**:290-9.
- Fujino, T., T. Fujiyoshi, S. Yashiki, S. Sonoda, H. Otsuka, Y. Nagata. 1992. HTLV-I transmission from mother to fetus via placenta. *Lancet* **340**:1157.
- Furukawa, Y., J. Fujisawa, M. Osame, M. Toita, S. Sonoda, R. Kubota, S. Ijichi, and M. Yoshida. 1992. Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-infected T cells in HTLV-I-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* **80**:1012-6.
- Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-4.

- Gallo, D., L.M. Penning, and C.V. Hanson.** 1991. Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2345-7.
- Gallo, R.C.** 1991. Human retroviruses: a decade of discovery and link with human disease. *J. Infect. Dis.* **164**:235-243.
- Gazzolo, L., and M.D. Due Dodon.** 1987. Direct activation of resting T lymphocytes by human T lymphotropic virus type I. *Nature* **326**:714-7.
- Gessain, A., E. Boeri, R. Yanagihara, R.C. Gallo, and G. Franchini.** 1993. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *J. Virol.* **67**:1015-1023.
- Gessain, A., R.C. Gallo, and G. Franchini.** 1992. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.* **66**:2288-95.
- Gessain, A., R. Yanagihara, G. Franchini, R.M. Garruto, C.L. Jenkins, A.B. Ajdukiewicz, R.C. Gallo, and D.C. Gajdusek.** 1991a. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**:7694-7698.
- Gessain, A., R. Yanagihara, C. Gajdusek, et al.** 1991b. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world: identification of novel HTLV-I variants in Africa and Melanesia. *Annual Meeting*, Bethesda, September 1-8.
- Gessain, A., E. Boeri, R. Yanagihara, R.C. Gallo, and G. Franchini.** 1993. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *J. Virol.* **67**:1015-1023.
- Goh, W.C., J. Sodroski, C. Rosen, et al.** 1985. Sub-cellular localization of the product of the long open reading frame of human T-cell leukemia virus type I. *Science* **227**:1227-8.
- Goubau, P., J. Desmyter, P. Swanson, M. Reynders, J. Shih, I. Surmont, K. Kazadi, and H. Lee.** 1993. Detection of HTLV-I and HTLV-II infection in africans using type-specific envelope peptides. *J. Med. Virol.* **39**:28-32.
- Gray, G.S., M. White, T. Bartman, and D. Mann.** 1990. Envelope gene sequence of HTLV I isolate MT-2 and its comparison with other HTLV-I isolates. *Virology* **177**:391-5.
- Green, P.L., Y. Xie, and L.S.Y. Chen.** 1991. The rex proteins of human T-cell leukemia virus type II differ by serine phosphorylation. *J. Virol.* **65**:546-550.
- Gross, L.** 1951. "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **78**:27-39.
- Hall, W.W., H. Takahashi, C. Liu, M.H. Kaplan, O. Scheewind, S. Ijichi, K. Nagashima, and R.C. Gallo.** 1992. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *J. Virol.* **66**:2456-63.
- Hammes, S.R., W.C. Greene, et al.** 1993. Multiple arginine residues within the basic domain of HTLV-I rex are required for specific RNA binding and function. *Virology* **193**:41-9.
- Haseltine, W.A., J. Sodroski, R. Patarca, et al.** 1984. Structure of 3' terminal region of type II human T lymphotropic virus: evidence of new coding region. *Science* **225**:419-21.
- Haseltine, W.A., and E.F. Terwilliger.** 1990. Structure and function of human pathogenic retroviruses. *Retrovirus Biology and Human Disease*. Gallo RC, and Wong-Staal F (eds).

- Hayes, C.G., J.P. Burans, R.B. Oberst. 1991. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in a population from the Philippines: Evidence for cross reactivity with *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* **163**:257.
- Heneine, W., R.F. Khabbaz, R. Lal, J.E. Kaplan. 1992a. 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.* **30**:1605-7.
- Heneine, W., T. Woods, D. Green, K. Fukuda, R. Giusti, L. Castillo, B. Armien, F. Gracia, J.E. Kaplan. 1992b. Detection of HTLV-II in breastmilk of HTLV-II infected mothers. *Lancet* **340**:1157-1158.
- Herr, V., D. Ambruso, M. Fairfax, A. Neumann, P. Swanson, and H. Lee. 1993. Transfusion-associated transmission of human T-lymphotropic virus types I and II: experience of a regional blood center. *Transfusion* **33**:208-211.
- Hidaka, M., J. Inoue, M. Yoshida, and M. Seiki. 1988. Posttranscriptional regulator (rex) of HTLV-I initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* **7**:519-23.
- Higashi, J., S. Kumagai, M. Hatanaka, H. Imura. 1992. The Presence of Antibodies to Purified p24-gag Protein of HTLV-I in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Virus Genes* **6**:357-364.
- Hirata, M., J. Hayashi, A. Noguchi, K. Nakashima, W. Kajiyama, S. Kashiwagi, T. Sawada. 1992. The effects of breastfeeding and presence of antibody to p40tax protein of human T-cell lymphotropic virus type-I on mother to child transmission. *Int. J. Epidemiology* **21**:989-994.
- Hjelle, B., O. Appenzeller, R. Mills, S. Alexander, N. Torrez-Martinez, R. Jahnke, and G. Ross. 1992. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* **339**:645-6.
- Hjelle, B., and R. Chaney. 1992. Sequence variation of functional HTLV-II tax alleles among isolates from an endemic population: lack of evidence for oncogenic determinant in tax. *J. Med. Virol.* **36**:136-141.
- Hjelle, B., S. Cyrus, S. Swenson. 1992. Evidence for sexual transmission of human T-lymphotropic virus type II. *Ann. Intern. Med.* **116**:90-1.
- Hjelle, B., S. Cyrus, S. Swenson, and R. Mills. 1991. Serologic distinction between human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. *Transfusion* **31**:731-6.
- Hjelle, B., R. Mills, S. Swenson, G. Mertz, C. Key, S. Allen. 1991. Incidence of hairy cell leukemia, *mycosis fungoides*, and chronic lymphocytic leukemia in first known HTLV-II-endemic population. *J. Infect. Dis.* **163**:435-40.
- Hjelle, B., R. Scalf, and J. Swenson. 1990. High frequency of human T-cell leukemia virus type II infection in New Mexico blood donors: determination by sequence-specific oligonucleotide hybridization. *Blood* **76**:450-4.
- Hoxie, J.A., D.M. Matthews, D.B. Clines. 1984. Infection of human endothelial cells by human T cell leukaemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7591-5.
- Inostroza, J., P. Díaz, and C. Saunier. 1991. Prevalence of antibodies to HTLV I in South American Indians (Mapuches) from Chile. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**:507-8.
- Isono, T., K. Ogawa, and A. Seto. 1990. Antiviral effect of zidovudine in the experimental model of adult T cell leukemia in rabbits. *Leuk. Res.* **14**:841-7.
- Ito, S., N. Yamamoto, K. Nomoto, K. Sasaki, and K. Onodera. 1989. Selective killing of human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cell lines by a danavaricin Fc derivative. *J. Antibiot.* **42**:779-87.
- Jacks, T., H. Varmus. 1985. Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting. *Science* **230**:1237-43.

- Jarret, W., E. Crawford, W. Martin, et al. 1964. Leukemia in the cat. A virus-like particle associated with leukaemia (lymphosarcoma). *Nature* **202**:267-8.
- Kajiyama, W., S. Kashiwagi, H. Ikematsu, J. Hayashi, H. Nomura, K. Okochi. 1986. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J. Infect. Dis.* **154**:851-7.
- Kalland, K.H., E. Langhoff, H.J. Bos, H. Gottlinger, and W.A. Haseltine. 1991. Rex-dependent nucleolar accumulation of HTLV I mRNAs. *New. Biol.* **3**:389-97.
- Kaplan, J.E., E. Abrams, N. Shaffer, R.O. Cannon, A. Kaul, K. Krasinski, et al. 1992. Low risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type II in non-breast-fed infants. *J. Infect. Dis.* **166**:892-5.
- Kalyanaraman, V.S., M.G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, M. Miyoshi, D. Golde, and R.C. Gallo. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**:571-3.
- Kalyanaraman, V.S., M. Jarvis-Morar, M.G. Sarngadharan, et al. 1984. Immunological characterization of the low molecular weight gag gene proteins p19 and p15 of human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) and demonstration of human natural antibodies to them. *Virology* **132**:61-70.
- Khabbaz, R.F., W.W. Darrow, T.M. Hartley, J. Witte, J.B. Cohen, J. French, P.S. Gill, J. Potterat, R.K. Sikes, R. Reich, et al. 1990. Seroprevalence and risk factors for HTLV-III infection among female prostitutes in the United States. *JAMA* **263**:60-4.
- Khabbaz, R.F., D. Harter, M. Lairmore, C.R. Horsburgh, E.E. Schoenbaum, B. Roberts, T.M. Hartley, and G. Friedland. 1991. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *J. Infect. Dis.* **163**:252-6.
- Khabbaz, R.F., W. Heneine, A. Grindon, T.M. Hartley, G. Shulman, and J.E. Kaplan. 1992. Indeterminate HTLV serologic results in U.S. blood donors: Are they due to HTLV-I or HTLV-II? *J. Acq. Immune Def. Synd.* **5**:400-4.
- Khabbaz, R.F., I.M. Onorato, R.O. Cannon, T.M. Hartley, B. Roberts, B. Hosein, J.E. Kaplan. 1992. Seroprevalence of HTLV-I and HTLV-II among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. *N. Engl. J. Med.* **326**:375-80.
- Kim, J.H., P.A. Kaufman, S.M. Hanly, L.T. Rinsky, and W.C. Greene. 1991. Rex transregulation of human T-cell leukemia virus type II gene expression. *J. Virol.* **65**:405-414.
- Kinoshita, K., S. Hino, and T. Amagashiki. 1984. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Gann.* **75**:103-5.
- Kinoshita, T., A. Tsujimoto, and K. Shimotohno. 1991. Sequence variations in LTR and env regions of HTLV-I do not discriminate between the virus from patients with HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. *Int. J. Cancer* **47**:491-5.
- Kleinman, S., L. Fitzpatrick, H. Lee. 1990. Transmission of HTLV-III from blood donors to their sexual partners. Abstract 5516. *International Society of Blood Transfusion/American Association of Blood Banks Joint Congress AABB*. Arlington, VA.
- Kleinman, S., P. Swanson, J.P. Allain, and H. Lee. 1993. Transfusion transmission of human T lymphotropic virus types I and II: serologic and polymerase chain reaction results in recipients identified through look-back investigations. *Transfusion* **33**:4-6.
- Kline, R.L., T. Brothers, N. Halsey, R. Boulos, M.D. Lairmore, and T.C. Quinn. 1991. Evaluation of enzyme immunoassays for antibody to human T-lymphotropic viruses type III. *Lancet* **337**:30-3.

- Komurian, F., F. Pelloquin, and G. de Thé. 1991. In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J. Virol.* **65**:3770-8.
- Koyanagi, Y., N. Yamamoto, N. Kobayashi, et al. 1984. Characterization of human B cell lines harboring both adult T-cell leukemia (ATL) virus and Epstein-Barr virus derived from ATL patients. *J. Gen. Virol.* **65**:1781-9.
- Kwok, S., D. Gallo, C. Hanson, N. McKinney, B. Poiesz, J.J. Sninsky. 1990. High prevalence of HTLV-II among intravenous drug abusers: PCR confirmation and typing. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:561.
- Lairmore, M.D., S. Jacobson, F. García, B.K. De, L. Castillo, M. Larreategui, B.D. Roberts, P.H. Levine, W.A. Blattner, and J.E. Kaplan. 1990. Isolation of human T-cell lymphotropic virus type 2 from Guaymí Indians in Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:8840-8844.
- Lal, R.B., D.L. Rudolph, M.D. Lairmore, R.F. Khabbaz, M. Garfield, J.E. Coligan, and T.M. Folks. 1991a. Serologic discrimination of HTLV-I and HTLV-II infection by using a synthetic peptide based enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.* **163**:416.
- Lal, R.B., D.L. Rudolph, K.P. Griffis, K. Kitamura, M. Honda, J.E. Coligan, and T.M. Folks. 1991b. Characterization of immunodominant epitopes of gag and pol gene encoded proteins of human T lymphotropic virus type-I. *J. Virol.* **65**:1870-6.
- Lal, R.B., D.L. Rudolph, J.E. Kaplan, B. Hjelle, P.H. Levine, J.E. Coligan, and R.P. Viscidi. 1992. Identification of immunodominant epitopes in envelope glycoprotein of human T lymphotropic virus type-II. *Virology* **186**:274-9.
- Lal, R.B., W. Heneine, D.L. Rudolph, W.B. Present, D. Hofhienz, T.M. Hartley, R.F. Khabbaz, and J.E. Kaplan. 1991. Synthetic peptide-based immunoassays for distinguishing between human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections in seropositive individuals. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2253-8.
- Lee, T.H., J.E. Coligan, T. Honma, et al. 1984. Human T-cell leukemia virus-associated membrane antigens (HTLV-MA): identity of the major antigens recognized after virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3856-60.
- Lee, H., E. Anderson, J.P. Allain, and A. Gonzaga. 1989a. HTLV-I infection in Brazil. *Blood* **73**:1742.
- Lee, H., P. Swanson, V.S. Shorty, J.A. Zack, J.D. Rosenblatt, and I.S. Chen. 1989b. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. *Science* **244**:471-5.
- Leider, J.M., P. Palese, and F.I. Smith. 1988. Determination of the mutation rate of a retrovirus. *J. Virol.* **62**:84-3091.
- Lentino, J.R., C.T. Pachucki, D.M. Schaaff, et al. 1991. Seroprevalence of HTLV-I/II and HIV-I infection among male intravenous drug abusers in Chicago. *J. AIDS* **4**:901-9.
- Lipka, J.J., P. Santiago, L. Chan, G.R. Reyes, K.P. Samuel, W.A. Blattner, G.M. Shaw, C.V. Hanson, J.J. Sninsky, and S.K. Fong. 1991. Modified Western blot assay for confirmation and differentiation of human T cell lymphotropic virus types I and II. *J. Infect. Dis.* **164**:300-3.
- Lipka, J.J., I. Miyoshi, K.G. Hadlock, G.R. Reyes, T.P. Chow, W.A. Blattner, G.M. Shaw, C.V. Hanson, D. Gallo, L. Chan, et al. 1992. Segregation of human T cell lymphotropic virus type I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J. Infect. Dis.* **165**:268-72.
- Liquori, A.M. 1991. Myelin basic protein (MBP) displays significant homologies with gag core proteins of HTLV retroviruses. *J. Theor. Biol.* **148**:279.
- Lombardi, V., M.G. Carrillo, M. Alimandi, et al. 1991. Overt and latent HIV-I and HTLV-I infection in cohorts of at high risk individuals in Argentina. *Molecular and Cellular Probes* **5**:409-17.

- Loughran, T.P., T. Coyle, M.P. Sherman, G. Starkebaum, G.D. Ehrlich, F.W. Ruscetti, and B.J. Poiesz. 1992. Detection of human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II, in a patient with large granular lymphocyte leukemia. *Blood* **80**:1116-9.
- Lunardi-Iskandar, Y., A. Gessain, V.H. Lam, R.C. Gallo. 1993. Abnormal in vitro proliferation and differentiation of T cell colony-forming cells in patients with tropical spastic paraparesis/human T lymphocyte virus type I (HTLV-I)-associated myeloencephalopathy and healthy HTLV-I carriers. *J. Exp. Med.* **177**:741-750.
- Macchi, B.L., M. Popovic, P. Allavera, J. Ortaldo, P. Rossi, R.C. Gallo, and E. Bonmassar. 1987. In-vitro susceptibility of different human T cell subpopulations and resistance of large granular lymphocytes to HTLV-I infection. *Int. J. Cancer* **40**:1-6.
- Malik, K., J. Even, and A. Karpas. 1988. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T-cell leukemia type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATLV/HTLV-I subgroup. *J. Gen. Virol.* **69**:1695-710.
- Maloney, E.M., E.L. Murphy, J.P. Figueroa, W.N. Gibbs, B. Cranston, B. Hanchard, M. Holding-Cobham, K. Malley, and W.A. Blattner. 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. II. Geographic and ecologic determinants. *Am. J. Epidemiol.* **133**:1125-34.
- Mann, A., and W.A. Blattner. 1991. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and II: etiologic role in human disease. *Transfusion* **31**:67-75.
- Mann, A., R.J. Wilks, E.L. Murphy, G. Haynes, J.P. Figueroa, M. Barnet, B. Hanchard, W.A. Blattner. 1992. A prospective study of transfusion transmission of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer* **51**:886-91.
- Matsushita, S., H. Mitusya, M.S. Reitz, and S. Broder. 1987. Pharmacological inhibition of in vitro infectivity of human T-cell leukemia virus type I. *J. Clin. Invest.* **80**:394-400.
- McDonald, D., T.J. Hope, and T.G. Parslow. 1992. Posttranscriptional Regulation by the Human Immunodeficiency Virus Type-I Rev and Human T-Cell Leukemia Virus Type-I Rex Proteins Through a Heterologous RNA Binding Site. *Journal of Virology* **66**:7232-7238.
- McClure, M.A., M.S. Johnson, D.F. Feng, and R.F. Doolittle. 1988. Sequence comparisons of retroviral proteins: relative rates of change and general phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2469-73.
- McGuire, K.L., V.E. Curtiss, E.L. Larson, and W.A. Haseltine. 1993. Influence of human T cell leukemia virus type I tax and rex on interleukin 2 gene expression. *J. Virol.* **67**:1590-1599.
- McLaughlin, G.L., M.J. Benedir, G.H. Campbell. 1987. Repeated immunogenic amino acid sequences of *Plasmodium* species share sequence homologies with proteins from humans and human viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**:258.
- McKhann, G., C.J. Jr. Gibbs, C.A. Mora, P.E. Rodgers-Johnson, P.P. Liberski, W.J. Gdula, and V. Zaninovic. 1989. Isolation and characterization of HTLV I from symptomatic family members with tropical spastic paraparesis (HTLV I encephalomyeloneuropathy). *J. Infect. Dis.* **160**:371-9.
- Merl, S., B. Kloster, J. Moore, et al. 1984. Efficient transformation of previously activated and dividing T lymphocytes by human T cell leukemia-lymphoma virus. *Blood* **64**:967-74.
- Minagawa, H., T. Yoshida, Y. Itoyama, C.A. Mora, P. Albert, R. Mori. 1992. Neutralizing antibodies against HTLV-I in HTLV-I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) patients and asymptomatic carriers. *Neurology* **42**:2210-2212.

- Minamoto, G.Y., J.W.M. Gold, D.A. Scheinberg, W.D. Hardy, N. Chein, E. Zuckerman, L. Reich, K. Dietz, T. Gee, J. Hoffer, et al. 1988. Infection with human T-cell leukemia virus type I in patients with leukemia. *N. Engl. J. Med.* **318**:219-22.
- Miyamoto, K., T. Kamiya, J. Minowada, N. Tomita, and K. Kitajima. 1991. Transformation of CD8+ T-cells producing a strong cytopathic effect on CD4+ T-cells through syncytium formation by HTLV-II. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**:1178-1183.
- Montagne, J., C. Berand, I. Crenon, G. Lombard-Platet, L. Gazzolo, A. Sargeant, and P. Jalinot. 1990. Tax induction of the HTLV-I 21pb enhance requires cooperation between two cellular DNA-binding proteins. *EMBO J.* **9**:957-64.
- Morgan, D.A., F.W. Ruscefti, and R.C. Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* **193**:1007-10.
- Murphy, E. 1990. The epidemiology of HTLV-I: modes of transmission and their relation to patterns of seroprevalence. In: Blattner WA, ed. *Human Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press:295-305.
- Murphy, E.L., J.P. Figueroa, W.N. Gibbs, M. Holding-Cobham, B. Cranston, K. Malley, A.J. Bodner, S.S. Alexander, and W.A. Blattner. 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am. J. Epidemiol.* **133**:1114-24.
- Nagamine, M., Y. Nakashima, S. Uemura, et al. 1991. DNA amplification of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA in breast milk of HTLV-I carriers. *J. Infect. Dis.* **164**:1024-5.
- Nagashima, K., M. Yoshida, M. Seiki. 1986. A single species of pX mRNA of human T-cell leukemia virus type I encodes trans-activator p40x and two other phosphoproteins. *J. Virol.* **60**:394-9.
- Nam, S.H., M. Kidokoro, H. Shida, and M. Hatanaka. 1988. Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease. *J. Virol.* **62**:3718-28.
- Narita, M., M. Shibata, T. Togashi, Y. Koga. 1989. Vertical transmission of human T cell leukemia virus type I. *J. Infect. Dis.* **163**:204.
- Oka, T., Y. Ohtsuki, H. Sonobe, M. Furihata, and I. Miyoshi. 1990. Suppressive effects of interferons on the production and release of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Arch. Virol.* **115**:65-73.
- Oka, T., J. Iwata, M. Furihata, H. Sobone, I. Miyoshi, and Y. Ohtsuki. 1992. Inhibitory effects of human interferons on the immortalization of human, but not rabbit, T lymphocytes by human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Int. J. Cancer* **51**:915-20.
- Orita, S., A. Saiga, S. Takagi, T. Tanaka, K. Okumura, Y. Aono, Y. Hinuma, and H. Igarashi. 1991. A novel alternatively spliced viral mRNA transcribed in cells infected with human T cell leukemia virus type I is mainly responsible for expressing p21X protein. *FEBS Letter* **295**:121-34.
- Orita, S., S. Takagi, A. Saiga, N. Minoura, K. Araki, K. Kinoshita, T. Kondo, Y. Hinuma, and H. Igarashi. 1992. Human T cell leukemia virus type I p21X mRNA: constitutive expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with adult T cell leukemia. *J. Gen. Virol.* **73**:2283-2289.
- Paine, E., J. García, T.C. Philpott, G. Shaw, and L. Ratner. 1991. Limited sequence variation in human T-lymphotropic virus type I isolates from North American and African patients. *Virology* **182**:111-123.
- Palker, T.J. 1992. Human T-cell lymphotropic viruses: Review and prospects for antiviral therapy. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **3**:127-39.

- Palumbo, P.E., S.H. Weiss, B.J. McCree, S.S. Alexander, T.N. Denny, C.W. Klein, and R. Altman. 1992. Evaluation of human T cell lymphotropic virus infection in a cohort of injecting drug users. *J. Infect. Dis.* **166**:896-9.
- Pesce, C.D., F. Ciprani, C. D'Onofrio, E. Alvino, C.F. Perno, E. Bonmassar, and R. Calio. 1987. Low concentrations of suramin can reduce in vitro infection of cord blood lymphocytes with HTLV-I during long term culture. *Antiviral Res.* **8**:247-60.
- Pestka, S., J.A. Langer, K.C. Zoon, and C.E. Samuel. 1987. Interferons and their functions. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:727-77.
- Pique, C., T. Tursz, and M.C. Dokhčlar. 1990. Mutations introduced along the HTLV-I envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelop conservation? *EMBO J.* **9**:4243-8.
- Pique, C., D. Pham, T. Tursz, and M.C. Dokhčlar. 1992. Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *J. Virol.* **66**:906-13.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, et al. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7415-9.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, J.W. Mier, et al. 1980. T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:6815-9.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, M.S. Reitz, et al. 1981. Isolation of a new type-C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature* **294**:268-71.
- Pombo de Oliveira, M.S., E. Matutes, L.C. Famadas, T.F. Schulz, M.L. Calabro, N. Nucci, M.J. Andrada-Serpa, R.S. Tedder, R.A. Weiss, and D. Catovsky. 1990. Adult T cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. *Lancet* **336**:987-90.
- Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, et al. 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **225**:497-500.
- Ramirez, P.H., R.R. Jimenez, M.B. Santovenia, et al. 1991. Very low seroprevalence of HTLV-I/II in Cuba-antibodies in blood donors and in hematological and nonhematological patients. *Vox Sanguinis* **61**:277-8.
- Ratner, L., T. Philpott, and D.B. Trowbridge. 1991. Nucleotide sequence analysis of isolates of human T-lymphotropic virus type I of diverse geographical origins. *AIDS Research and Human Retroviruses* **7**:923-41.
- Reeves, W.C., P. Levine, P. Cuevas, E. Quiroz, E. Maloney, and W.C. Saxinger. 1990. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus in the Republic of Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**:374-9.
- Roberts, B.D., S.K. Foung, J.J. Lipka, J.E. Kaplan, K.G. Hadlock, G.R. Reyes, L. Chan, W. Heneine, R.F. Khabbaz. 1993. Evaluation of an immunoblot assay for serological confirmation and differentiation of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *J. Clin. Microbiol.* **31**:260-264.
- Roman, G.C., L.N. Roman, and M. Osame. 1990. Human T lymphotropic virus type I neurotropism. *Prog. Med. Virol.* **37**:190-210.
- Rosenblatt, J.D., D.W. Golde, W. Wachsman, J.V. Giorgi, A. Jacobs, G.M. Schmidt, S. Quan, J.C. Gasson, I.S.Y. Chen. 1986. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.* **315**:372.
- Rous, P. 1911. Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate. *JAMA* **56**:198-204.
- Ruano, G., K. Kidd. 1991. Coupled amplification and sequencing of genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2815-2819.



- Rudolph, D.L., and R.B. Lal.** 1993. Discrimination of human T-lymphotropic virus type-I and type-II infections by synthetic peptides representing structural epitopes from the envelope glycoproteins. *Clin. Chem.* **39**:288-292.
- Saggiaro, D., M. Panozzo, and L. Chicco-Bianchi.** 1990. Human T-lymphotropic virus type I transcriptional regulation by methylation. *Cancer Res.* **50**:4958-73.
- Sakai, H., H. Siomi, H. Shida, R. Shibata, T. Kiyomasu, and A. Adachi.** 1990. Functional comparison of transactivation by human retrovirus rev and rex genes. *J. Virol.* **64**:5833-9.
- Sakashita, A., T. Hattori, C.W. Miller, H. Suzushima, N. Asou, K. Takatsuki, and H.P. Koeffler.** 1992. Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. *Blood* **79**:477-80.
- Sakurai, M., S. Yamaoka, T. Nosaka, M. Akayama, A. Tanaka, M. Maki, and M. Hatanaka.** 1992. Transforming activity and the level of tax protein: effect of one point mutation in HTLV-I tax gene. *Int. J. Cancer* **52**:323-328.
- Saksena, N.K., M.P. Sherman, R. Yamagihara, D.K. Dube, and B.J. Poiesz.** 1992. LTR sequence and phylogenetic analysis of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. *Virology* **189**:1-9.
- Schneider, J., N. Yamamoto, Y. Hinuma, et al.** 1984. Precursor polypeptides of adult T-cell leukemia virus: detection and antisera against isolated polypeptides gp68, p24 and p19. *J. Gen. Virol.* **65**:2249-58.
- Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama, and M. Yoshida.** 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Sci. USA* **80**:3618-3622.
- Sherman, M.P., N.K. Saksena, D.K. Dube, R. Yamagihara, and B.J. Poiesz.** 1992. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J. Virol.* **66**:2556-63.
- Shimada, K., C.S. Koh, N. Yanagisawa, N. Tsukada, and M. Osame.** 1993. Anti-lymphocyte antibodies and circulating immune complexes in the sera of patients with myelopathy associated with human T lymphotropic virus type I. *J. Neuroimmunol.* **42**:161-166.
- Shimotohno, K., Y. Takahashi, N. Shimizu, T. Gojobori, D.W. Golde, I.S.Y. Chen, M. Miwa, and T. Sugimura.** 1985. 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* **82**:3101-5.
- Shoji, S., A. Tashiro, and Y. Kubota.** 1988. Antimyristoylation of gag proteins in human T-cell leukemia and human immunodeficiency viruses with N-myristoyl glycinal diethylacetal. *J. Biochem.* **103**:747-9.
- Shulz, T.F., M.L. Calabro, J.G. Hoad, C.V. Carrington, E. Matutes, D. Catovsky, R.A. Weiss.** 1991. HTLV-I envelope sequence from Brazil, the Caribbean, and Romania: clustering of sequences according to geographic origin and variability in an antibody epitope. *Virology* **184**:483-91.
- Smith, D., S. Lucas, and M. Jacewicz.** 1993. Multiple cerebral hemorrhages in HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology* **43**:412-414.
- Sommerfelt, M.M., B.P. Williams, P.R. Clapham, et al.** 1989. Human T cell leukaemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science* **242**:1557-9.
- Sowa, J.M.** 1992. HTLV-I Myelopathy. *Neurology* **42**:2232-2233.
- Stuver, S.O., N. Tachibana, A. Okayama, S. Shioiri, Y. Tsunetoshi, K. Tsuda, and N.E. Mueller.** 1993. 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.* **167**:57-65.

- Sugiyama, H., H. Doi, K. Yamaguchi, Y. Tsuji, T. Miyamoto, S. Hino. 1986. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T cell lymphotropic virus type I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J. Med. Virol.* **20**:253-60.
- Sundström, C., K. Nilsson. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* **17**:565-77.
- Tachibana, N., A. Okayama, S. Ishihara, S. Shioiri, K. Murai, K. Tsuda, N. Goya, Y. Matsuo, M. Essex, S. Stuver, and N. Mueller. 1992. High HTLV-I proviral DNA level associated with abnormal lymphocytes in peripheral blood from asymptomatic carriers. *Int. J. Cancer* **51**:593-595.
- Takahashi, K., T. Takezaki, T. Oki, et al. 1991. Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. *Int. J. Cancer* **49**:673-7.
- Takatsuki, K., J. Uchiyama, K. Sagawa, et al. 1977. Adult T-cell leukemia in Japan. In: Senos S, Takatu F, Irino S (ed). *Topics in haematology*. Excerpta Medica. Amsterdam:73-7.
- Tochikura, T.S., H. Nakashima, and N. Yamamoto. 1989. Antiviral agents with activity against human retroviruses. *J. AIDS* **2**:441-7.
- Tsukasaki, K., S. Ikeda, K. Murata, T. Maeda, S. Atogami, H. Sohda, S. Momita, T. Jubashi, Y. Yamada, M. Mine, et al. 1993. Characteristics of chemotherapy-induced clinical remission in long survivors with aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk. Res.* **17**:157-166.
- Tuke, P.W., P. Luton, J.A. Garson. Differential Diagnosis of HTLV-I and HTLV-II. 1992. Infections by restriction enzyme analysis of nested PCR products. *J. Virol. Methods* **40**:163-174.
- Ueda, K., K. Kusuhara, K. Tokugawa, C. Miyazaki, K. Okada, Y. Maeda, H. Shiraki, and K. Fukada. 1993. Mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) an extended follow-up study on children between 18 and 22-24 years old in Okinawa, Japan. *Int. J. Cancer* **53**:597-600.
- Vallejo, A. y A. García Saiz. 1992. Biología de los retrovirus HTLV-I y HTLV-II. *Pub. de SEISIDA* **3**:287-93.
- Van den Hoek, J.A., R.A. Coutinho, H.J. Van Haastrecht, et al. 1988. Prevalence and risk factors of HIV infections among drug users and drug using prostitutes in Amsterdam. *AIDS* **2**:55-60.
- Vasquez, P., G. Sanchez, C. Volante, L. Vera, E. Ramirez, G. Soto, and H. Lee. 1991. Human T-lymphotropic virus type I: new risk for Chilean population [letter]. *Blood* **78**:850-1.
- Verdier, M.F. Denis, G. Leonard, A. Sangare, S. Patillaud, M. Prince-David, M Essex. 1990. Comparison of immunofluorescence, particle agglutination, and enzyme immunoassays for detection of human T-cell leukemia virus type I antibody in African sera. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1988-1993.
- Vernant, J.C., L. Maurs, A. Gessain, F. Barin, O Gout, J.M. Delaporte, K. Sanhadji, G. Buisson, and G. de The. 1987. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and epidemiological study of 25 cases. *Ann. Neurol.* **21**:123-30.
- Von Ruden, T., and E. Gilboa. 1989. Inhibition of human T-cell leukemia virus type I replication in primary human T-cell that express antisense RNA. *J. Virol.* **63**:677-82.
- Waldmann, T.A., C.K. Goldman, K.F. Bongiovanni, S.O. Sharrow, M.P. Davey, K.B. Cease, S.J. Greenberg, and D. Long. 1988. Therapy of patients with human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia with anti-Tac, a monoclonal antibody to the receptor for interleukin-2. *Blood* **72**:1805-16.
- Waldmann, T.A. 1991. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* **252**:1657-62.

- Weber, J.N., N. Banatvala, S. Clayden, K.P. McAdam, S. Palmer, H. Mouldsdales, J. Tosswill, P. Dilger, R. Thorpe, and S. Amann. 1989. HTLV-I infection in Papua New Guinea: evidence for serologic false positive. *J. Infect. Dis.* **159**:1025-1028.
- Wiktor, S.Z., J.M. Mann, N. Nzilabmi, H. Francis, P. Piot, W.A. Blattner, and T.C. Quinn. 1990. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) among female prostitutes in Kinshasa, Zaire. *J. Infect. Dis.* **161**:1073-7.
- Wiktor, S.Z., S. Jacobson, S.H. Weiss, G.M. Shaw, J.S. Reuben, V.J. Shorty, D.E. McFarlin, and W.A. Blattner. 1991. Spontaneous lymphocyte proliferation in HTLV-II infection. *Lancet* **337**:327-8.
- Williams, A.E., C.T. Fang, D.J. Slamon, B.J. Poiesz, S.G. Sandler, W.F. Darr, G. Shulman, E.I. McGowan, D.K. Douglas, R.J. Bowman, et al. 1988. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV I infection in US blood donors. *Science* **240**:643-6.
- World Health Organization. 1989. HTLV-infections and associated diseases. Geneva.
- World Health Organization. 1990. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS):proposed WHO criteria for interpreting results from western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II. *Weekly Epidemiologic Record* **37**:281-283.
- Yamamoto, N., T. Matsumoto, Y. Koyanagi, et al. 1982. Unique cell lines harboring both Epstein-Barr virus and adult T-cell leukemia virus, established from leukemia patients. *Nature* **299**:367-9.
- Yanagihara, R., V.R. Nerurkar, and A.B. Ajdukiewicz. 1991. Comparison between strains of HTLV-I isolated from inhabitants of the Solomon Islands and Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.* **164**:443-9.
- Yip, M.T., and I.S.Y. Chen. 1990. Modes of transformation by the human T cell leukemia viruses. *Mol. Biol. Med.* **7**:33-44.
- Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:2031-5.
- Zack, J.A., A.J. Caan, J.P. Lugo, and I.S. Chen. 1988. AIDS virus production from infected peripheral blood T cells following HTLV-I-induced mitogenic stimulation. *Science* **240**:1026-9.
- Zamora, T., V. Zaminovic, M. Kajiwara, H. Hayami, and K. Tajima. 1990. Antibody to HTLV-I in indigenous inhabitants of the Andes and the Amazon regions of Colombia. *Jpn. J. Cancer. Res.* **81**:715-8.
- Zella, D., L. Mori, M. Sala, et al. 1990. HTLV-II infection in Italian drug abusers. *Lancet* **336**:574.
- Zucker-Franklin, D., W. Craig Hooper, and B.L. Evatt. 1992. Human lymphotropic retroviruses associated with mycosis fungoides: evidence that human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) as well as HTLV-I may play a role in the disease. *Blood* **6**:1537-1545.