

Tesis Doctoral

# Epidemiología molecular del virus linfotrópico T-humano tipo 1 (HTLV-1) en Argentina: análisis étnico-geográfico y variabilidad viral

Eirin, María Emilia

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Eirin, María Emilia. (2011). Epidemiología molecular del virus linfotrópico T-humano tipo 1 (HTLV-1) en Argentina: análisis étnico-geográfico y variabilidad viral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Eirin, María Emilia. "Epidemiología molecular del virus linfotrópico T-humano tipo 1 (HTLV-1) en Argentina: análisis étnico-geográfico y variabilidad viral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS LINFOTRÓPICO  
T- HUMANO TIPO 1 (HTLV-1) EN ARGENTINA: ANÁLISIS  
ÉTNICO-GEOGRÁFICO Y VARIABILIDAD VIRAL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad  
de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lic. María Emilia Eirin**

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Mirna Marcela Biglione

CONSEJERA DE ESTUDIOS: Dra. Elsa Damonte

LUGAR DE TRABAJO: Centro Nacional de Referencia para el SIDA (CNRS),  
Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011.



# EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS LINFOTRÓPICO

## T- HUMANO TIPO 1 (HTLV-1) EN ARGENTINA: ANÁLISIS

### ÉTNICO-GEOGRÁFICO Y VARIABILIDAD VIRAL

El objetivo principal de esta tesis fue profundizar los conocimientos sobre la infección por HTLV-1 en Argentina. Con tal fin, se estimó la prevalencia de infección en comunidades originarias de las provincias de Jujuy, San Juan, Misiones, Formosa y Chaco, detectándose una prevalencia en *Kollas* de 9.8% que confirmó un área naturalmente endémica en Jujuy con una restricción étnico-geográfica ya descrita. El análisis filogenético determinó que las secuencias HTLV-1, tanto de Jujuy como de Buenos Aires, eran subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental (aA) a excepción de dos, cuyas muestras provenían de individuos residentes de Buenos Aires nacidos en Perú (Neu2 y Neu6) que fueron clasificados en un nuevo subgrupo denominado F. Por otro lado, se detectaron 4 secuencias evolutivamente relacionadas con referencias de Sudáfrica, demostrando la circulación de cepas virales de origen africano en Buenos Aires. Al estudiar el origen étnico de los individuos HTLV-1 positivos, se evidenció la presencia de un componente autóctono predominante, detectándose los cuatro haplogrupos panamericanos (A2, B2, C1, D1) en los *Kollas* y en el 73% de los residentes de Buenos Aires. En el resto se identificaron haplogrupos alóctonos con un 17,9% de origen Euroasiático Occidental (H, J, T, U, N1b), un 4,5% de origen Africano (L0 y L1) y un 1,5% de origen Asiático Oriental (M7a). Las cepas clasificadas filogenéticamente como de origen africano pertenecieron a individuos con haplogrupo B2 amerindio, mientras que una

secuencia de Buenos Aires que agrupó junto a las de Jujuy provenía de un donante con haplogrupo de origen africano. Estos datos sugieren el contacto entre estas poblaciones y sustenta la hipótesis de introducción de la infección con la llegada de esclavos africanos en la época pos-colombina. El análisis *in silico* de las secuencias LTR reveló una menor variabilidad en individuos asintomáticos en comparación con pacientes con HAM/TSP y ATL ( $p < 0,05$ ), mientras que la variabilidad de la proteína viral Tax fue significativamente menor en secuencias de portadores de Jujuy que en individuos asintomáticos o con enfermedad de Buenos Aires. De todos modos, no se detectó un polimorfismo determinado asociado con la presencia de patología.

**Palabras clave:** HTLV-1, epidemiología, filogenia, variabilidad genómica y origen étnico.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC  
VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) IN ARGENTINA: ETHNIC- GEOGRAPHIC  
ANALYSIS AND VIRAL DIVERSITY

The aim of this thesis was to gain an in-depth knowledge of HTLV-1 infection in Argentina. In order to achieve this, HTLV-1 prevalence was estimated in aboriginal populations of Jujuy, San Juan, Misiones, Formosa and Chaco provinces, yielding a 9.8% among *Kollas* and confirming a naturally endemic area in Jujuy, associated to an ethnic-geographic restriction as previously described. The phylogenetic analysis determined that HTLV-1 sequences, both from Jujuy and Buenos Aires, were Cosmopolitan subtype Transcontinental (aA) subgroup with the exception of two sequences belonging to residents of Buenos Aires city but born in Peru (Neu2 y Neu6) who were classified in a new subgroup named F. On the other hand, 4 sequences evolutionally related to South Africa were detected, demonstrating the presence of viral strains with African origin in Buenos Aires city. Regarding the ethnic origin of all HTLV-1 positive individuals, the presence of a predominant autochthonous component (Pan-American haplogroups A2, B2, C1, D1) was detected, being all four present in *Kollas* and in 73% of Buenos Aires inhabitants. In the other populations alloctonous haplogroups were identified with a 17,9% Occidental Eurasian origin (H, J, T, U, N1b), a 4,5% African origin (L0 y L1) and a 1,5% de Oriental Asian origin (M7a). The strains phylogenetically classified as African belonged to individuals with Amerindian B2 haplogroup, while a sequence from Buenos Aires which grouped together with sequences from Jujuy belonged to a

blood donor with an African origin haplogroup. This data suggests contact between these populations and sustains the hypothesis of the introduction of HTLV-1 infection with the arrival of African slaves in the post-Columbian era. The analysis *in silico* of LTR sequences revealed a lower variability in asymptomatic individuals compared to HAM/TSP and ATL patients ( $p < 0,05$ ), while the variability of Tax viral protein was significantly lower in asymptomatic individuals from Jujuy compared to asymptomatic or HAM/TSP and ATL patients from Buenos Aires. Regardless this situation, not a specific polymorphism was detected in association to the presence of pathologies.

**Key words:** HTLV-1, epidemiology, phylogeny, genomic variability and ethnic origin.

## *AGRADECIMIENTOS*

---



*A Leandro Jones y Darío Dileria, por su aporte en el área de Filogenia.*

*A Claudio Bravi, por su ayuda en el análisis del ADN mitocondrial.*

*A Marian, por su constante contribución y excelente predisposición para ayudar siempre.*

*A Dani Rabinovich, por sus consejos paternales, sus sugerencias a nivel profesional y por sobre todo sus chistes, los cuales no termina nunca de contar porque lo invade la risa.*

*A María Mercedes Ávila y Liliana Martínez Peralta, por haber estado siempre dispuestas a ayudarme y por sus tan sabios consejos en aquellos momentos difíciles.*

*A todos los colegas que formaron parte de los estudios multicéntricos en las diferentes provincias del país, por el entusiasmo y la pasión con la que llevaron adelante los trabajos.*

*A Sergio Mazzini, por la ayuda que me brindó a diario y por las innumerables correcciones de inglés de las publicaciones que surgieron de esta tesis.*

*A Ceci, mi amiga, a quien quiero muchísimo y con la cual he iniciado mi camino por la biología, allá lejos por el año 1999. Gracias por escucharme siempre...*

*A Mara, Sol, Caro, Darío y Alejandrino, por haber compartido conmigo a diario y por haberme contenido en aquellos momentos no tan lindos que a veces nos sorprenden en la vida.*

*A los chicos de atención a pacientes Mirta, Claudio y Ricardo, por ser una parte fundamental en el desarrollo de esta tesis.*

*A todos y cada uno de los integrantes del CNRS que contribuyeron ya sea aportando su conocimiento o desde la práctica, en la realización de este trabajo.*

*Un agradecimiento muy especial a la Dra. Mirna Biglione por haber confiado en mí desde el principio, brindándome un lugar en el grupo HTLV-1/2. Porque creíste en mí cuando otros no lo hicieron, dándome la oportunidad de realizar mi doctorado.*



*A mis Arieles, a quienes amo con todo mi corazón.  
Gracias a ambos por recorrer este camino conmigo,  
y hacerme tan feliz con la familia que hemos formado.  
Me llenan de orgullo...*

*A Mami, Papi, Matu y Sol a quienes adoro..  
Gracias por el apoyo, el aliento y la compañía  
desde siempre brindados...*



**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNmt:** ADN mitocondrial

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AP:** aglutinación de partículas

**ATL:** Leucemia a células T del adulto.

**BLV:** Virus de la Leucemia Bovina

**C-terminal:** carboxilo terminal

**dNTP:** deoxinucleótidos tri-fosfato

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**HAM/TSP:** Mielopatía asociada al HTLV-1 o Paraparesia espástica Tropical/ HTLV-1 associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis

**HBZ:** Cierre de leucina básico de HTLV-1/ *HTLV-1 basic-Leucine Zipper*

**HIV-1:** virus de la inmunodeficiencia humana/ *human immunodeficiency virus*

**HLA:** antígeno leucocitario humano

**hn-PCR:** hemi-nested PCR

**HSPGs:** proteoglicanos de heparán-sulfato/*heparan sulfate proteoglicans*

**HTLVs:** Virus Linfotrópicos T Humanos

**HTLV-1:** Virus Linfotrópico T Humano tipo 1

**HTLV-2:** Virus Linfotrópico T Humano tipo 2

**HTLV-3:** Virus Linfotrópico T humano tipo 3

**HTLV-4:** Virus Linfotrópico T Humano tipo 4

**I:** integrasa

**IL-2:** interleuquina-2

**IS:** índice de similitud

**ITS:** infección de transmisión sexual

**Kb:** kilobases

**KD:** kilodalton

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LTR:** repetición terminal larga/ *long terminal repeat*

**LZR:** Región del cierre de leucina/ *Leucine Zipper Region*

**MTOC:** centro organizador de los microtúbulos/ *microtubule-organizing center*

**NES:** secuencia de exportación nuclear/ *Nuclear Export Sequence*

**NJ:** vecino más cercano/ *Neighbour Joining*

**NLS:** señal de localización nuclear/ *nuclear localization signaling*

**n-PCR:** PCR anidada/ *nested PCR*

**NRP1:** neuropilina

**N-terminal:** amino terminal

**ORF:** marco de lectura abierto/ *opening reading frame*

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PNH:** primates no humanos

**PR:** proteasa

**PTLVs:** Virus Linfotrópicos T de Primates

**rc:** repetición central

**rd:** repetición distal

**rp:** repetición proximal

**RRE:** elemento de respuesta a Rex/ *Rex Responsive Element*

**STLVs:** Virus linfotrópicos T simianos

**SNC:** sistema nervioso central

**TBE:** buffer solución de tris- borato-EDTA

**TCR:** Receptor de células T/ *T cell receptor*

**TMH:** transmisión madre-hijo

***T. pallidum:*** *Treponema pallidum*

**TR:** transcriptasa reversa

**TS:** trabajadoras/es sexuales

**TRE:** elemento de respuesta a Tax/ *Tax Response Element*

**UDI:** usuarios de drogas inyectables

**UV:** ultravioleta

**VDRL:** prueba de laboratorio para enfermedades venéreas/ *venereal disease*

*research laboratory test*

**WB:** Western Blot

**ZF:** dedo de zinc/ *zinc finger*





<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Descubrimiento de los Virus Linfotrópicos T Humanos	2
2. Origen y Clasificación de los HTLVs	4
3. Introducción y distribución de los HTLVs en América	5
Hipótesis Pre-colombina	6
Hipótesis Post-colombina	7
4. Origen étnico e infección por HTLV	8
<b>VIRUS LINFOTRÓPICO T-HUMANO TIPO 1 (HTLV-1)</b>	<b>11</b>
5. Epidemiología de la infección	11
5.1. Prevalencia	11
5.2. Vías de Transmisión	13
Transmisión Madre a Hijo (TMH)	13
Transmisión Sexual	13
Transmisión Parenteral	14
6. Filogenia	14
7. Enfermedades asociadas	15
7.1. Paraparesia Espástica Tropical o Melopatía asociada al HTLV-1 (HAM/TSP)	16
7.2. Leucemia a células T del Adulto (ATL)	17
8. Situación de la infección en Argentina	17
9. Estructura del virión	19
10. Organización Genómica	22
10.1. Genes estructurales	23
10.2. Genes reguladores y accesorios	24
10.3. Proteínas reguladoras	24
Tax	24
Rex	27
HBZ	27
10.4. Proteínas accesorias	28
p12	28
p30	28
p21	29
10.5. Regiones regulatorias no codificantes (LTR)	29
Región U3	29
Regiones R y U5	32
11. Ciclo de Replicación	33
12. Variabilidad y Patogenia	35

12.1. Región LTR	36
12.2. Variantes de la proteína Tax	37
<b>HIPÓTESIS</b>	38
<b>OBJETIVOS</b>	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
<b>ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS</b>	44
<b>1. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR HTLV-1</b>	44
1.1. Población estudiada	44
1.2. Consideraciones Éticas	44
1.3. Reclutamiento de Individuos	45
1.4. Obtención de datos epidemiológicos	45
1.5. Obtención de la muestra y procesamiento	46
1.5.1. Obtención de Plasma	46
1.5.2. Obtención de ADN	46
1.6. Diagnóstico de Infecciones	47
1.6.1. Infección por HTLV-1/2	47
1.6.2. Infección por HIV-1	50
1.6.3. Infección por <i>T. pallidum</i>	50
1.7. Análisis Estadístico	50
<b>ESTUDIOS MOLECULARES</b>	51
<b>2. FILOGENIA DEL HTLV-1</b>	51
2.1. Muestras analizadas	51
2.2. Región genómica analizada y amplificación por PCR	52
2.3. Reacción de secuenciación y edición de secuencias	53
2.4. Análisis Filogenético	54
2.5. Análisis estadístico del clado divergente	55
2.5.1. Test de Shimodaira-Hasegahua	55
2.5.2. Análisis de Similitud	56
<b>3. ANALISIS DEL ADN MITOCONDRIAL</b>	57
3.1. Población estudiada	57
3.2. Región analizada	57
3.3. Amplificación por PCR	57
3.4. Reacción de secuenciación y detección de mutaciones diagnósticas	58
<b>ESTUDIOS DE VARIABILIDAD</b>	60
<b>4. ANÁLISIS GENÓMICO</b>	60
4.1. Muestras analizadas	60
4.2. Región LTR: elementos de respuesta Tax (TRE-1 y TRE-2)	60
4.2.1. Detección de mutaciones	60
4.2.2. Amplificación por PCR de la región LTR	60
4.3. Proteína Tax: mutaciones no sinónimas en dominios funcionales	62
4.3.1. Amplificación por PCR	62

<b>RESULTADOS</b>	64
<b>ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS</b>	65
1. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR HTLV-1 Y DETECCIÓN DE OTRAS INFECCIONES EN COMUNIDADES ORIGINARIAS	65
1.1. Infección por HTLV-1	65
1.2. Otras infecciones	65
1.3. Características epidemiológicas de los grupos estudiados	66
<b>ESTUDIOS MOLECULARES</b>	69
2. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE CEPAS HTLV-1 DETECTADAS EN BUENOS AIRES Y JUJUY	69
2.1. Residentes de Buenos Aires	69
2.2. Comunidad <i>Kolla</i>	74
2.3. Análisis de Residentes de Buenos Aires y comunidad de Jujuy	77
2.4. Clado Divergente: Descripción de un nuevo subgrupo	81
2.4.1. Origen filogenético del Clado Divergente	81
2.4.2. Análisis de Similitud	83
3. ORIGEN ÉTNICO Y HTLV-1: PREDOMINIO DE HAPLOGRUPOS AMERINDIOS	84
3.1. Residentes de Buenos Aires	84
3.2. Individuos originarios	85
<b>VARIABILIDAD VIRAL</b>	86
4. PRESENCIA DE MUTACIONES EN EL GENOMA PROVIRAL	86
4.1. Región promotora viral: secuencias LTR	86
4.1.1. Elemento de respuesta a Tax tipo 1: TRE-1	89
4.1.2. Elemento de respuesta a Tax tipo 2: TRE-2	91
4.2. Región codificante de Tax: análisis de mutaciones no sinónimas en dominios funcionales	93
4.2.1. Residentes de Buenos Aires	93
4.2.2. Individuos originarios	95
<b>DISCUSIÓN</b>	96
<b>CONCLUSIONES</b>	116
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	121



## 1. DESCUBRIMIENTO DE LOS VIRUS LINFOTRÓPICOS T-HUMANOS

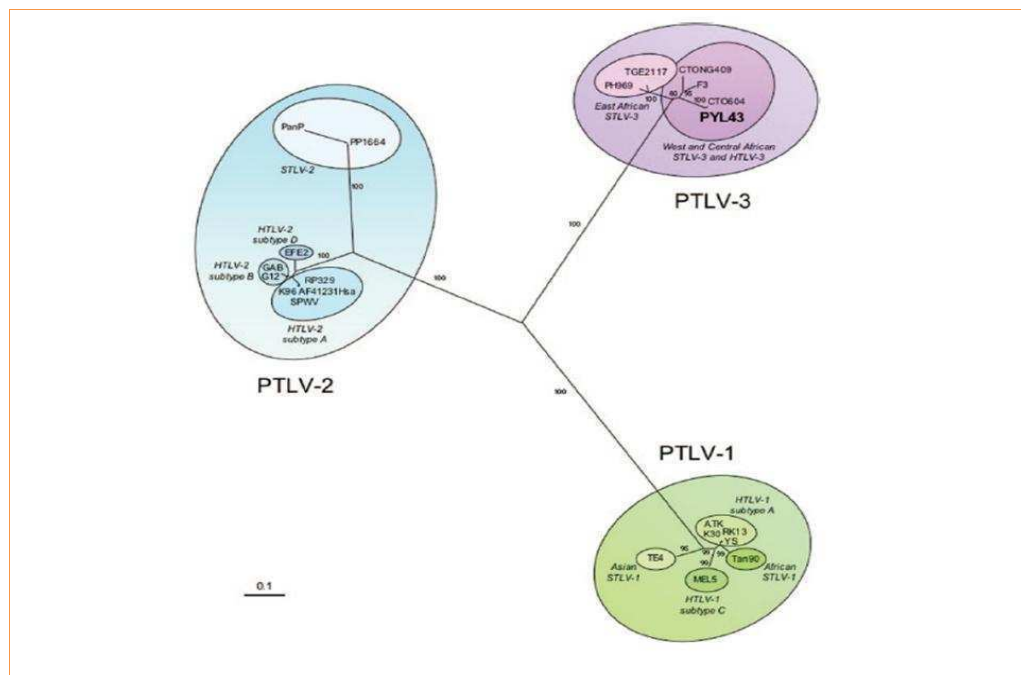
Los primeros retrovirus descubiertos fueron los responsables de la leucemia aviaria, a principios del siglo 20. Tiempo después, en 1911, Peyton Rous logró recuperar un virus asociado al sarcoma de pollo y la importancia de su hallazgo le fue reconocida 60 años más tarde a través de un Premio Nobel (1). Pero el descubrimiento, aislamiento y caracterización de una familia de retrovirus linfotrópicos humanos que estaban asociados a un espectro diverso de enfermedades de células T, solo pudo concretarse sobre la base de avances posteriores en el campo de la biología.

Durante la década de los 70, se comprobó en los retrovirus la existencia de la transcriptasa reversa (TR), enzima que era diferente a las polimerasas celulares (2). Consecutivamente se iniciaron investigaciones tendientes a detectar la presencia de retrovirus en humanos, lográndose estudios que en 1980 culminaron con el primer aislamiento del Virus Linfotrópico T Humano tipo 1 (HTLV-1) (3). El descubrimiento de la interleuquina-2 (IL-2) fue fundamental para este hallazgo, ya que su empleo permitió mantener linfocitos humanos en cultivo y establecer líneas celulares (4). Por otra parte, el cuadro clínico de la leucemia de células T del adulto (ATL), descrita por Uchiyama y colaboradores en el sudoeste del Japón con una distribución geográfica circunscripta, sugirió la participación de un agente transmisible (5). Posteriormente, se descubrió el HTLV-2 en 1982, segundo retrovirus humano, aislado a partir de un paciente norteamericano que padecía una leucemia T atípica a tricoleucocitos (6).

Pasaron más de dos décadas de investigación hasta que en el año 2005, el grupo de Gessain y colaboradores reportó el descubrimiento del HTLV-3 en tres individuos asintomáticos de Camerún. En todos ellos, el diagnóstico serológico no fue consistente con algún patrón de Western Blot (WB) conocido al testearse las muestras con equipos comerciales para detección de infección por HTLV-1/2. El mismo año, el grupo de Wolfe y colaboradores, reveló la existencia de un cuarto tipo viral aislado en un individuo de Camerún, cuyo diagnóstico serológico al igual que para el HTLV-3, no permitió confirmar el tipo viral clasificándolo como HTLV-4 mediante estudios moleculares y filogenéticos (7,8).

## 2. ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LOS HTLVs

La clasificación actual de los HTLVs se basa en el análisis de la estructura genómica y en la homología de sus secuencias nucleotídicas. Pertenecen a la familia Retroviridae, género Deltaretrovirus, el cual comparten junto con los Virus Linfotrópicos T Simianos (STLVs) y el Virus de la Leucemia Bovina (BLV) (9). Filogenéticamente, los HTLVs se agrupan junto con los STLVs dentro de los Virus Linfotrópicos T de Primates (PTLVs, del inglés *Primates T-Lymphotropic Viruses*), distinguiéndose los filogrupos PTLV-1 (HTLV-1/STLV-1), PTLV-2 (HTLV-2/STLV-2) y PTLV-3 (HTLV-3/STLV-3) (Figura 1).



**Figura 1. Filogenia de los PTLVs.** Árbol de Neighbour Joining (NJ) de 6,8kb del genoma viral que incluyó los genes *gag-pol-env-tax*. Se evidencia un origen común entre los STLV-1/HTLV-1; STLV-2/HTLV-2 y STLV-3/HTLV-3, respectivamente. Adaptado de Calatini *et al.*, 2006.

Todos ellos están compuestos por virus de origen humano y simiano cercanamente emparentados entre sí, a excepción del grupo PTLV-4, que por el momento incluye sólo al virus humano (HTLV-4), no habiéndose identificado aún su contraparte simiana.

Geográficamente, el surgimiento de los HTLVs se habría dado en Asia, a través de múltiples saltos interespecie de primates no humanos (PNH) infectados a humanos. Una evidencia la constituye la secuencia del HTLV-1 altamente divergente denominada Mel5, aislada de un habitante de las islas Salomón, Melanesia, la cual es ancestral respecto de todas secuencias de HTLV-1 estudiadas hasta el momento. Así, el análisis filogenético muestra a Mel5 más cercanamente relacionada con secuencias de STLV-1 aisladas de especies de primates asiáticos muy antiguos (10). Posteriormente, la migración a África de estos PNH infectados, habría diseminado los distintos STLVs en otros géneros de primates de la región posibilitando así, más episodios de transmisión interespecie y dando origen a la diversidad del HTLV-1 que actualmente se conoce (11).




### 3. INTRODUCCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HTLVs EN AMÉRICA

Los HTLV-1/2 se encuentran distribuidos en distintas poblaciones en forma esporádica o endémica, detectándose la infección en los 13 países Sudamericanos (12). Se han formulado dos hipótesis, no excluyentes, que intentan explicar la introducción de la infección en el continente americano: **Hipótesis Pre-colombina y Post-Colombina.**

✚ **Hipótesis Pre-colombina:** postula una antigua introducción de los HTLV-1/2 a través de las primeras oleadas humanas que ingresaron por el estrecho de Bering, integradas por grupos pertenecientes a distintas familias lingüísticas, algunos infectados por HTLV-1 y otros por HTLV-2. Las mismas se habrían asentado en el territorio, aislándose unas de otras por la falta de un lenguaje común, produciendo en consecuencia una distribución diferencial de ambos retrovirus. Luego, la transmisión horizontal y vertical, perduraron la infección en estos grupos generalmente aislados, constituyendo verdaderos focos endémicos de infección natural fuertemente asociados a las familias lingüísticas (11).

Una evidencia de esta hipótesis lo constituye la fuerte restricción étnico/geográfica para la infección por HTLV-1/2 que actualmente se observa en nuestro continente. Así, se detecta infección endémica por HTLV-1 en comunidades originarias de las tierras altas precordilleranas de América incluyendo a las etnias Kamsa y Paez (Colombia); Aymara (Perú y Bolivia); Quechua, Galpones y Huiliches (Chile) y *Kollas* (Noroeste argentino) (13). Además, la detección de secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN) del HTLV-1 en momias de 1500 años de

antigüedad halladas en los Andes del Norte de Chile y en momias bolivianas, representa otra evidencia de la presencia de la infección en el continente desde tiempos remotos (14). Por otro lado, existen focos naturalmente endémicos para la infección por HTLV-2 en comunidades originarias de las tierras bajas de América, incluyendo a los grupos étnicos Pume, Guahibo y Yaruro (Venezuela); los Wayuu (Colombia); Cayapo, Kraho, y Kaxuyana (Brasil); y Toba, Pilaga y Wichi (Argentina) (11).

 **Hipótesis Post-Colombina:** postula el ingreso de los HTLV-1/2 luego de la colonización española de América. Por un lado, la llegada de esclavos africanos 400 años atrás, y a mediados del siglo pasado el ingreso de inmigrantes asiáticos principalmente de Japón (país endémico para la infección por HTLV-1), contribuyeron a la introducción y diseminación de cepas retrovirales circulantes en África y en el sudoeste Japonés (11). Es por ello que se han descrito áreas endémicas para la infección por HTLV-1 en ciudades con un importante componente genético de origen africano, como Salvador de Bahía en Brasil, Guyana Francesa, Guayana y Surinam o la ciudad de Tumaco en Colombia (15-17). Además, se han reportado prevalencias de infección por HTLV-1 en las comunidades japonesas de Sudamérica con cifras similares a las de áreas endémicas (18, 19). Estos datos fueron confirmados por análisis filogenético, evidenciándose una alta similitud entre las cepas circulantes en ambos casos y aquellas detectadas en África y el sudoeste Japonés (15, 16, 18, 20).

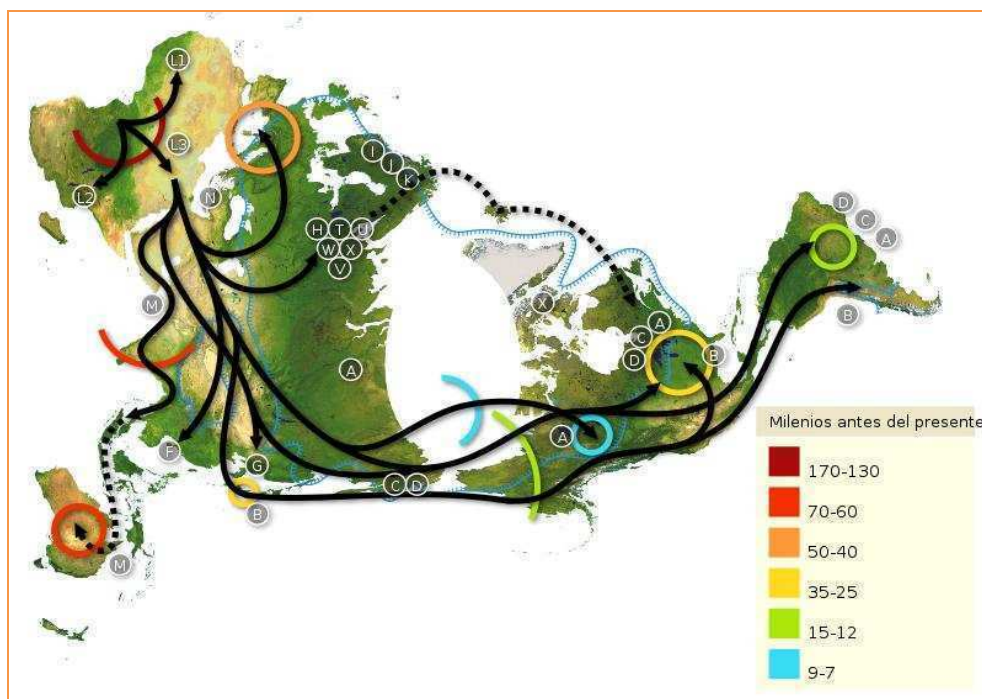
#### 4. ORIGEN ÉTNICO E INFECCIÓN POR HTLV

Las migraciones humanas han sido claves en la epidemiología de la infección de los HTLV-1/2, determinando su diseminación en el mundo y estableciendo patrones particulares de distribución, como ocurre con la restricción étnico/geográfica que se ha observado en nuestro continente.

El análisis de ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta molecular ampliamente utilizada para estudiar el origen étnico de un individuo. Su modo de herencia materna, ausencia de recombinación y alto número de copias permite la reconstrucción directa de la historia evolutiva de las poblaciones. Se asume que todos los tipos de ADNmt en el *pool* génico humano se relacionan a un antepasado matrilineal común y que la variación en la secuencia evolucionó por acumulación de mutaciones, las cuales son representadas en un árbol filogenético (véase [www.phylotree.org](http://www.phylotree.org)) (21). En particular, América fue el último continente en ser colonizado y el estudio del ADNmt permitió trazar las rutas y el tiempo en los cuales se dieron las distintas oleadas migratorias, la dispersión de sus pobladores y la dinámica del flujo génico entre las etnias que habitaban regiones geográficas diferentes.

Así, en nativos americanos se confirmó un origen asiático compartido por poblaciones originarias del Norte, Centro y Sur del continente, como consecuencia de múltiples eventos migratorios en distintos tiempos a través del estrecho de Bering (11000 a 40000 años atrás). En América se detectan un total de 9 haplogrupos distribuidos entre los nativos americanos, los cuales incluyen cuatro linajes

mayoritarios de origen asiático denominados A2, B2, C1 y D1; y en menor frecuencia los haplogrupos X2a (nativos norteamericanos), D2a (grupos Aleutianos y Esquimales), D3 (Esquimales) y D4h3 y C4c (22). Se postula que todas estas variantes junto con la variante X2a han estado presentes en las oleadas migratorias iniciales que poblaron las Américas, los cuales serían la fuente a partir de la que derivaron las variantes amerindias de ADNmt que se detectan en el presente (Figura 2).



**Figura 2. Mapa mundial de migraciones humanas, con el polo norte como centro.** África es el punto de partida, leyéndose desde la parte superior izquierda hasta América del Sur, en el extremo derecho. Las letras indican los haplogrupos detectados en cada región. Los patrones de migración están basados en estudios del ADNmt, observándose los haplogrupos distribuidos en el continente. Los números representan miles de años.

En Argentina, se ha detectado al haplogrupo B2 como mayoritario en comunidades originarias del Noroeste y las variantes A2 y B2 en la región del noreste. Por otro lado, todos los haplogrupos (A2, B2, C1 y D1) fueron descriptos en la región del Gran Chaco y en la región Central. Además, se han detectado los haplogrupos C1 y D1 con una alta incidencia en la región patagónica y la región de Tierra del Fuego (23).

Además, eventos posteriores al poblamiento inicial de América han contribuido en distintos grados al pool génico existente. Así, se pueden citar la migración forzada de esclavos africanos durante el tiempo de la colonia, las oleadas migratorias europeas desde mediados del siglo XIX disminuyendo a mediados del siglo XX y las más recientes migraciones internas y de países vecinos con un elevado componente hispano-nativo. Estudios recientes realizados en nuestro país, demuestran un predominio de haplogrupos amerindios entre la población actual en comparación con el aporte Europeo y en menor grado con el Africano (24, 25).

En relación a las migraciones humanas, el HTLV-1 ha sido inicialmente explorado como herramienta antropológica. Debido a su estabilidad, a su habilidad de integrarse en el genoma, su baja tasa de mutación y su modo de transmisión (principalmente de madre a hijo), representa un marcador para el estudio de los grupos humanos infectados. Es así, que el estudio de la filogenia viral y del origen étnico de las poblaciones infectadas aporta datos que pueden contribuir al momento de estudiar el origen geográfico de la infección.

# VIRUS LINFOTRÓPICO T HUMANO TIPO 1

## 5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

### 5.1. PREVALENCIA

La infección por HTLV-1 se encuentra diseminada globalmente y ya en el año 2003 se estimaba que afectaba entre 10 y 20 millones de personas, desconociéndose su cifra actual (26). La mayoría de los portadores permanecen asintomáticos durante toda su vida, pudiendo transmitir igualmente la infección. Las cifras de prevalencia reportadas difieren en relación al área geográfica, la composición socio-demográfica de la población en estudio y la presencia o no de conductas de riesgo para la infección. Así, encontramos áreas con focos de infección *naturalmente endémica* que se asocian a poblaciones originarias de África y Sudamérica que han adquirido la infección en tiempos remotos.

Globalmente, las cifras de prevalencia de infección clasifican las áreas geográficas como de alta endemia (sudoeste de Japón, África Central, Melanesia e islas Seychelles, con prevalencias  $\geq 15\%$ ); intermedia (Caribe y África Occidental, con prevalencias que oscilan del 5-14%) y de baja endemia (comunidades originarias de Colombia, Panamá, Brasil, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, con prevalencias  $< 5\%$ ) (27) (Figura 3).



Además, existen poblaciones o grupos con conductas de riesgo para la infección como usuarios de drogas inyectables (UDIs), trabajadoras/es sexuales (TS) e individuos HIV-1 positivos que presentan cifras de prevalencia elevadas aún en áreas no endémicas, donde además se pueden detectar casos *esporádicos* de infección. Estudios realizados en áreas no endémicas para la infección por HTLV-1, han descrito que la mayoría de los individuos seropositivos son inmigrantes provenientes de áreas endémicas o descendientes de los mismos, compañeros sexuales de una persona infectada por HTLV-1 o personas que presentan conductas de riesgo para la infección (27).

## 5.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN

El HTLV-1 se transmite de madre a hijo, por contacto sexual y por vía parenteral. Debido a que se disemina en el organismo por expansión clonal de las células infectadas, raramente se encuentra virus libre en plasma. Es así, como la forma que presenta mayor infectividad es la del virus asociado a células.

✚ **Transmisión Madre a Hijo (TMH):** ocurre principalmente a través de la lactancia y la probabilidad de adquirir la infección es mayor si ésta se prolonga más de seis meses. De los niños amamantados por madres HTLV-1 seropositivas, 10 a 25% se infectarán dependiendo de la población estudiada. Si bien la transmisión viral perinatal o intrauterina también existe, es mucho menos frecuente infectándose del 2 al 5% de los niños que no fueron amamantados. La seroconversión de los niños ocurre entre los 18 y 24 meses de edad (28).

✚ **Transmisión Sexual:** el HTLV-1 se encuentra en fluidos como el semen o secreciones vaginales. La transmisión sexual es más eficiente de hombre a mujer y de hombre a hombre, que de mujer a hombre. Para ambos, un factor coadyuvante a tener en cuenta es la presencia de enfermedades de transmisión sexual, como sífilis, infecciones genitales por Chlamydia tracomatis, herpes virus y úlceras genitales. En un estudio realizado en los Estados Unidos, se observó que aproximadamente 25 a 30% de las parejas sexuales de donantes de sangre HTLV-1/2 seropositivos sin otro antecedente de riesgo, también estaban infectados (29).

✚ **Transmisión parenteral:** el HTLV-1 se transmite por transfusiones o intercambio de jeringas contaminadas. La transmisión de HTLV-1 por transfusión sanguínea ocurre con mayor eficiencia si se trata de componentes celulares (glóbulos



rojos, plaquetas) o sangre entera. La mediana de tiempo de seroconversión luego de una transfusión se estima en 51 días (30).

## 6. FILOGENIA

El HTLV-1 se clasifica actualmente en 7 subtipos (a-g), los cuales se cree se originaron a partir de saltos interespecie entre PNH-humanos en eventos independientes seguidos por períodos variables de evolución, que ocurrieron en distintas áreas geográficas. El análisis filogenético de la región LTR ha permitido caracterizar al subtipo Cosmopolita ó a, diseminado por todo el mundo; a los subtipos b, d, e, f y g presentes en África Central; y por último al subtipo c, el más divergente de todos en Melanesia (31-33). Los HTLVs experimentan poca variación debido a que pueden replicar su información genética prescindiendo del uso de la enzima TR viral, impactando este hecho en la epidemiología molecular de la infección, detectándose únicamente en el subtipo Cosmopolita diversificación en cinco subgrupos (A-E) (20, 34). Uno de ellos, denominado Transcontinental ó A, se encuentra distribuido mundialmente; mientras que los subgrupos restantes (B-E) se pueden detectar en áreas geográficas específicas. Es así como el subgrupo B Japonés, se encuentra en Japón en alta frecuencia y en comunidades Japonesas de distintas partes del mundo, como ha sido reportado en Perú, Brasil y Bolivia (18-20). También, se ha detectado al subgrupo C presente en África en nativos descendientes de esclavos africanos de Guyana Francesa, cuyos ancestros ingresaron en el país durante la trata de esclavos (16). El subgrupo más recientemente descrito, se detectó en dos

individuos Peruanos descendientes de africanos, el cual fue denominado subgrupo E o Negros Peruanos (*Black Peruvian*) (20).

## **7. ENFERMEDADES ASOCIADAS**

El HTLV-1 ha sido reconocido como el agente etiológico de dos enfermedades específicas denominadas Mielopatía Asociada al HTLV-1 o Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) y Leucemia a Células T del Adulto (ATL), las cuales se presentan con mayor frecuencia en áreas endémicas de infección (35-38). Se ha descrito asociación de la infección con otras patologías inflamatorias como uveítis, dermatitis infecciosa, polimiositis, sinovitis, tiroiditis y neumonitis bronqueoalveolar (27). Se estima que 3 al 5% de los sujetos HTLV-1 seropositivos desarrollarán HAM/TSP o ATL a lo largo de su vida, sugiriéndose un contexto multifactorial implicado que involucra la carga proviral del inóculo al momento de la infección, el haplotipo HLA (del inglés *Human leukocyte antigen*) del individuo, la vía de infección primaria y la cepa viral, entre otros (39). Al presente no existen vacunas disponibles para prevenir la infección ni tratamientos efectivos para las patologías asociadas al HTLV-1.

### **7.1. PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL O MIELOPATÍA ASOCIADA AL HTLV-1 (HAM/TSP)**

Es una enfermedad neurológica progresivamente invalidante cuya génesis involucra destrucción celular e inflamación afectando de manera irreversible al

sistema nervioso central (SNC), en particular al tracto piramidal con predominio torácico. Se caracteriza por una paraparesia espástica bilateral simétrica con hiperreflexia de miembros inferiores y disfunción de la vejiga (neurogénica), además de haberse reportado disfunción sexual, constipación y otra serie de síntomas asociados al deterioro del SNC (40).

Se postula que el daño está mediado por el sistema inmune como consecuencia de una reacción autoinmune gatillada por el virus o por un efecto de destrucción citotóxica de las células T infectadas en esa zona (41). El período de incubación es de 15 a 20 años si la vía de transmisión es sexual o vertical, aunque el tiempo es menor si la infección es a partir de una transfusión, reportándose casos de desarrollo de la HAM/TSP a los 3 meses de la misma (42). La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en el sexo femenino, factor que junto con una edad mayor a 50 años y alta carga proviral ha sido asociado a una mayor progresión a HAM/TSP (43).

En la HAM/TSP se observa alto título de anticuerpos anti-HTLV-1 en suero/plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR), en general elevada carga proviral en sangre, e intensa respuesta de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica y en LCR, con reconocimiento predominante de epitopes presentes en la proteína viral Tax (41). Los criterios actuales de diagnóstico de HAM/TSP han sido establecidos por la Organización Mundial de la Salud. La confirmación del diagnóstico clínico de pacientes con mielopatía progresiva crónica que no padecen inmunodeficiencia, debe incluir además la detección de anticuerpos específicos anti-HTLV-1 en suero y LCR y

la exclusión de otras patologías como tumores de médula espinal o lesiones compresivas y otras neuropatías (44).

## 7.2. LEUCEMIA A CÉLULAS T DEL ADULTO (ATL)

La ATL es una leucemia linfocitaria T CD4<sup>+</sup> que presenta características clínicas semejantes a otras leucemias agudas, tales como infiltrados de células malignas en médula ósea, ganglios linfáticos y piel, afección de vísceras, huesos, pulmón e infecciones oportunistas con alteración de la función hepática, lesiones osteolíticas y distintos tipos de lesiones dermatológicas. Son patognomónicos los linfocitos pleomórficos con núcleos hipersegmentados en forma de trébol en sangre periférica e hipercalcemia. Se presentan formas clínicas crónicas, linfomatosas y latentes (45).

En la ATL, el virus expresa su capacidad oncogénica, primordialmente a través de los genes virales *tax* y *hbz*, cuyos productos alteran la expresión de genes celulares involucrados en el control de la replicación celular (46). La enfermedad se manifiesta con una frecuencia igual o mayor en hombres que en mujeres y en general una latencia mínima de 20 años, siendo la edad promedio de presentación de 50 años (45). Está fuertemente asociada a la adquisición de la infección en los primeros años de vida (transmisión vertical), lo que resulta en una mayor incidencia intrafamiliar.

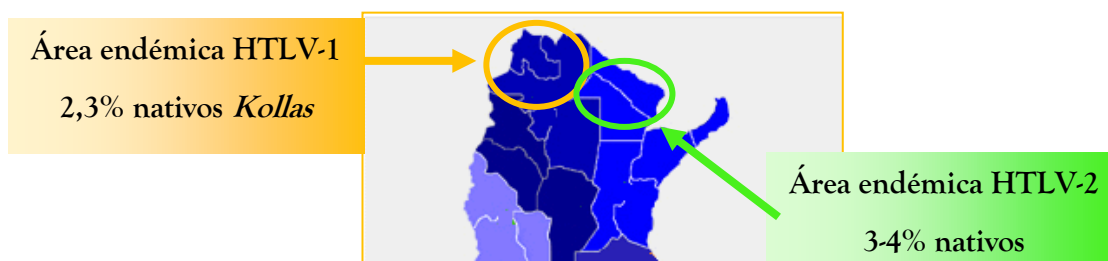
El diagnóstico debe considerar la clínica y resultados de laboratorio como la morfología de linfocitos, el inmunofenotipo, la histología de los tejidos afectados en los casos de linfoma; detección de anticuerpos anti-HTLV-1 en plasma/suero y del

genoma proviral en los cortes histológicos. Se deben excluir otras leucemias, como la leucemia promielocítica a células T, el síndrome de Sézary, linfomas a células T periféricos o la enfermedad de Hodgkin (47).

La ATL aguda tiene un curso rápidamente progresivo con una sobrevida de 6 a 9 meses, siendo común el sub-diagnóstico en ausencia de laboratorios especializados que permitan su clasificación en forma certera y rápida, antes de la precipitada evolución a un desenlace fatal como sucede en la mayoría de los casos. En cuanto al tratamiento, hasta el momento las terapias disponibles presentan una eficacia mínima con pocos individuos respondedores (48).

## 8. SITUACIÓN DE LA INFECCIÓN EN ARGENTINA

En nuestro país, la presencia del HTLV-1 se evidenció inicialmente en distintos grupos de riesgo en 1989, y posteriormente en donantes de sangre de la ciudad de Buenos Aires, con prevalencias similares a las observadas en áreas no endémicas de otras regiones del mundo (49). Así, Argentina fue considerada como área no endémica, hasta que se reportó una década después una alta prevalencia de HTLV-1 en donantes de sangre de Jujuy (0.9%) y Salta (0.7%) y en nativos *Kollas* (2.3%) de Jujuy, detectándose también focos de sus enfermedades asociadas y confirmando la presencia de un área endémica (50-53). Posteriormente, se dieron a conocer casos esporádicos de HAM/TSP y ATL en otras regiones no endémicas del país como Buenos Aires y San Juan (54-56). Asimismo, se evidenció la circulación del HTLV-1 en Tobas de Salta y Chaco, con cifras menores a las reportadas en la provincia de Jujuy, no detectándose la presencia de infección por HTLV-1 en Mapuches de San Luis y de Neuquén; Wichis, Matacos y Tobas de Formosa; y Chorotes de Chaco (49). En cuanto a la distribución de la infección en Argentina, podemos observar que, similar a lo que ocurre en América Latina, existe una restricción étnica/geográfica con comunidades originarias del Noroeste infectadas por HTLV-1 (familia Aymara de Salta y Jujuy), a diferencia de los que ocurre en otras comunidades originarias de la Región Chaqueña (familia Mataco-Guaycurú de Formosa y Chaco), en las cuales se ha detectado en forma endémica la presencia de infección por HTLV-2 (13) (Figura 4).

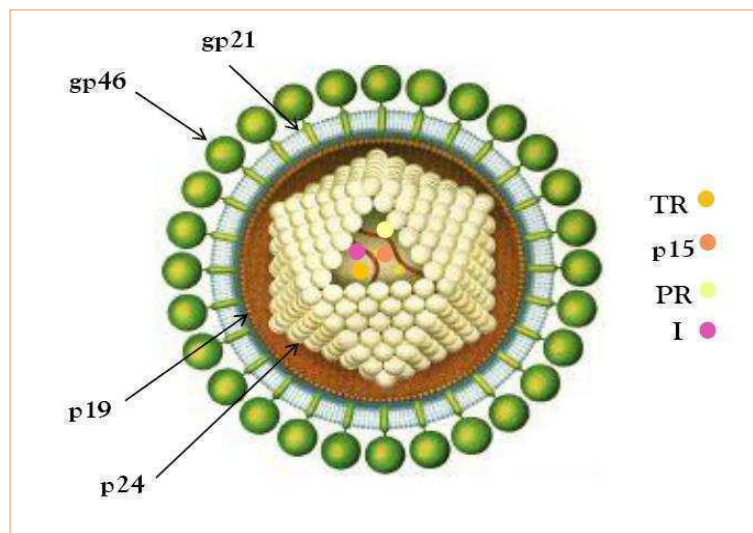


**Figura 4. Restricción étnica/geográfica de la infección por HTLV-1/2 en Argentina.** Mapa en el que se observan la región endémica para HTLV-1 (naranja) y la endémica para el HTLV-2 (verde).

Estudios recientes realizados en poblaciones en riesgo de nuestro país, han confirmado la circulación del HTLV-1 entre UDIs, TS y en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) de diferentes provincias (57-61). En relación a los genotipos circulantes se ha descrito al subtipo Cosmopolita/subgrupo Transcontinental (aA) como mayoritario, resultado esperado si se considera que este subgrupo es el que se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. El mismo fue detectado en nativos *Kollas* del Noroeste, en donantes de sangre de Córdoba, en un paciente con ATL oriundo de Entre Ríos y en portadores asintomáticos de la infección (dos de ellos de Buenos Aires y el otro de Misiones) (62-64). El subgrupo B japonés fue reportado en dos residentes de Buenos Aires (62).

## 9. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

El virión del HTLV-1 está constituido por una nucleocápside icosaédrica protegida por una envoltura, siendo el diámetro de la partícula viral madura de 110 a 140 nanómetros. La envoltura es adquirida por brotación a partir de la membrana celular, incorporando lípidos y proteínas del huésped. El componente proteico viral está representado por un multímero de dos proteínas: gp46 (envoltura) y gp21 (región transmembrana). Adherida a la cara interna de la envoltura se encuentra la proteína de matriz p19, la cual rodea a la cápside, constituida por la proteína p24. A su vez, la cápside contiene el genoma de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario (compuesto por dos cadenas idénticas), unido a la proteína p15 y a enzimas virales fundamentales para completar el ciclo de replicación: la transcriptasa reversa (TR), la Integrasa (I) y la proteasa (PR) (Figura 5) (65).

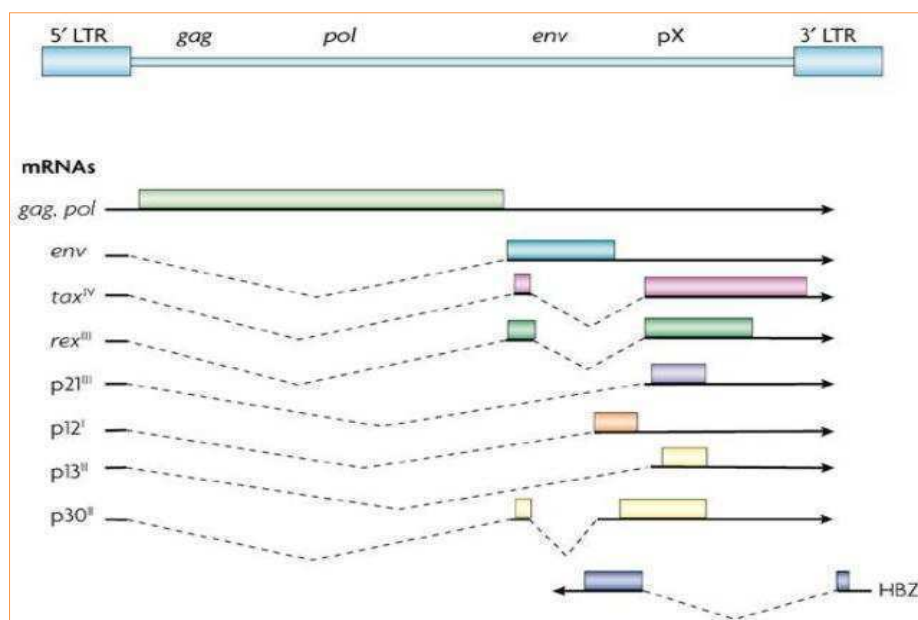


**Figura 5. Esquema de la partícula viral.** Se detalla la disposición de las proteínas codificadas por los genes *env* (gp46, gp21), *gag* (p19, p24, p15), *pol* (TR y I) y *pro* (PR).



## 10. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma de los HTLVs es de 9 Kb de longitud, compuesto por 2 moléculas de ARN modificadas según la forma reminiscente de los ARN mensajeros (ARNm) celulares, incluyendo *capping* y poliadenilación. Contiene elementos comunes a otros retrovirus, como los genes estructurales codificadores de las proteínas de envoltura (*env*), cápside (*gag*) y polimerasas (*pol*), flanqueados por secuencias largas repetitivas (LTR) en cada extremo, siendo el orden de los genes invariable: 5' *gag-pol-env* 3'. A diferencia de otros retrovirus, los HTLVs poseen una región en su extremo 3' denominada *pX*, con varios marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *opening reading frame*) conteniendo genes que codifican proteínas no estructurales implicadas en la regulación de la replicación y transcripción viral (66) (Figura 6).



**Figura 6. Organización genómica del HTLV-1.** El genoma, flanqueado por regiones repetitivas terminales (LTRs), contiene los genes estructurales (*gag*, *pol*, *env*) y la región *pX* codificante de las proteínas no estructurales Tax, Rex, p21, p12, p13, p30 y HBZ. Adaptado de Matsuoka *et al.*, 2007.

## 10.1 GENES ESTRUCTURALES

✚ El gen *gag* codifica una poliproteína precursora de 53 kd (p53), la cual es clivada por la proteasa viral en tres proteínas: p19, p24 y p15. La proteína p19 está adherida a la cara interna de la envoltura viral y a su vez, rodea a la cápside formada por la proteína p24. Ésta última presenta el mayor porcentaje de identidad (85%) entre los HTLVs, siendo inmunológicamente responsable de la reactividad cruzada observada entre el HTLV-1 y HTLV-2. La proteína p15 se mantiene asociada a dos copias de ARN viral dentro de la cápside (65).

✚ El gen *pol* (polimerasa) codifica para la enzima TR en su extremo N-terminal y para la integrasa (I) en el extremo C-terminal. La primera (ADN polimerasa ARN dependiente y ribonucleasa H) genera un ADN complementario y degrada la cadena de ARN; y la segunda, permite la integración del ADN viral en el genoma celular a través de una unión covalente (66, 67).

✚ El gen *pro*, yuxtapuesto a los genes *gag* y *pol*, corresponde a un ORF de 703 nucleótidos que codifica una proteasa generada por autoclivado responsable de la proteólisis del precursor codificado por el gen *gag*, participando también en la maduración de partículas virales luego de la brotación (68).

✚ El gen *env* codifica una poliproteína precursora denominada gp61, la cual luego de ser clivada por proteasas celulares da origen a las glicoproteínas gp46 y a la gp21. Se postula que ambas estarían involucradas en la entrada del virus a la célula, determinando el tropismo viral y siendo la proteína gp-46 esencial en la infectividad

viral. La interacción gp46-receptor celular induciría cambios conformacionales en la gp21 permitiendo la fusión de la membrana celular y viral (69).

## 10.2 GENES REGULADORES Y ACCESORIOS

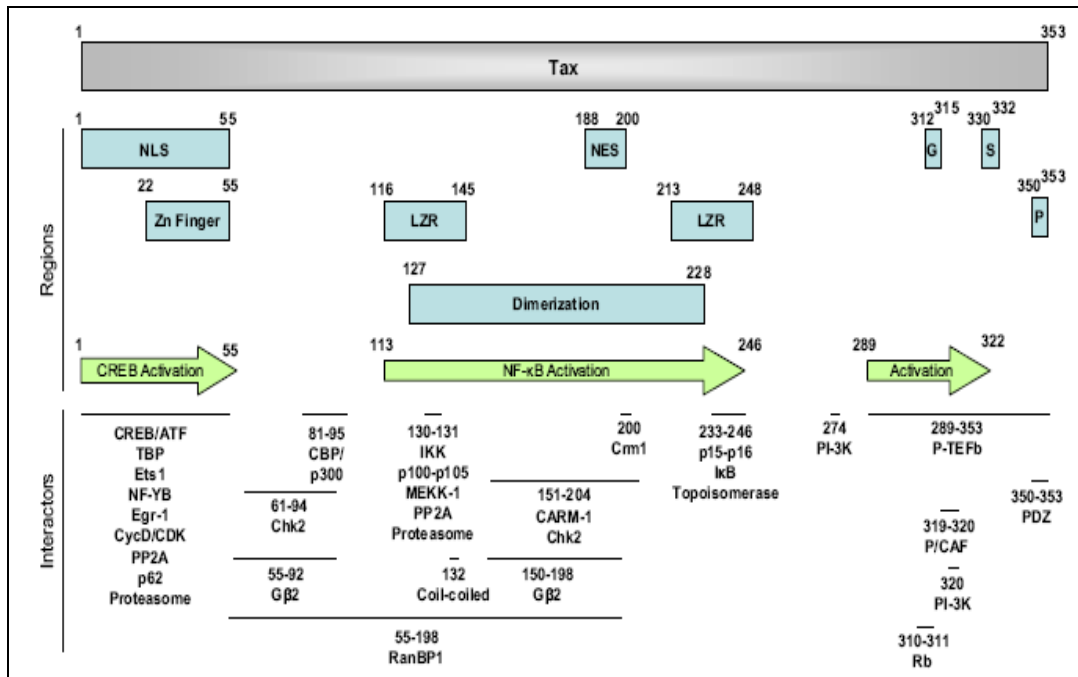
El HTLV-1 es un retrovirus complejo que utiliza mecanismos de *splicing* alternativo y codones iniciadores internos que permiten la expresión de varias proteínas reguladoras y accesorias. Las mismas son codificadas en la región *pX* a partir de cuatro ORF parcialmente solapados: p12 (ORF I), p13 y p30 (ORF II), Rex (ORF III) y Tax (ORF IV). Adicionalmente, la cadena complementaria del genoma viral codifica dos isoformas de una proteína reguladora denominada HBZ (70) (Figura 6).

## 10.3 PROTEÍNAS REGULADORAS

✚ La proteína **Tax** constituye un factor clave en el ciclo de replicación viral y en la inmunopatogénesis de la infección. Es una fosfoproteína de 40kd de características pleiotrópicas, que regula la transcripción y replicación viral y desregula la iniciación, elongación y transcripción de un amplio rango de genes celulares. Interacciona con un gran número de factores de transcripción basal y proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina. Su principal acción la ejerce sobre la región regulatoria viral LTR, en motivos específicos conservados denominados TREs (del inglés *Tax Response Element*). La habilidad para transactivar al LTR y genes celulares está modulada por fosforilaciones específicas en serina/treonina. Así, la localización nuclear de la proteína juega un rol central en su función reguladora

interviniendo en el reclutamiento de la maquinaria de transcripción hacia *enhancers* celulares que regulan genes involucrados principalmente en la proliferación. Hasta el momento se han reportado más de 100 dianas celulares, pudiendo interactuar con tan amplio número de factores gracias a que Tax contiene múltiples dominios de unión a proteínas (71).

Hacia el extremo N-terminal de la proteína, se distingue un motivo de dedo de Zinc (ZF, del inglés *Zinc Finger*) que interacciona con los factores de transcripción CREB/ATF, TBP, ETS1, NF-YB y Egr1 estabilizando la formación de homó u heterodímeros, ciclinas, nucleoproteínas, subunidades del proteasoma y la fosfatasa PP2A. Además contiene una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*). La unión de Tax/CREB induce un cambio conformacional en el dominio de unión al ADN de CREB, aumentando su afinidad por el material genético (72, 73). Hacia el centro de la proteína, se encuentra una región requerida para la dimerización, compuesta por dos motivos tipo cierre de leucina (LZR, del inglés *Leucine Zipper*) y una secuencia de exportación nuclear (NES, del inglés *nuclear exportation signal*). Por otro lado, existen aminoácidos localizados dentro del segundo LZR que regulan la asociación de Tax con p15INK4b, p16INK4a, DNA topoisomerasa e IKB $\gamma$  (71). Finalmente, la región C-terminal de la proteína contiene un dominio de activación, motivos de localización en el Golgi (G) y motivos de secreción (S) (Figura 7).



**Figura 7. Regiones funcionales de la proteína Tax.** NLS (secuencia de localización nuclear), NES (secuencia de exportación nuclear), G (motivo de localización en el Golgi), S (motivo de secreción), LZR (región tipo *leucine zipper*), P (dominio de unión a PDZ). Adaptado de Boxus, *et al.*, 2008.

Si bien se creía que Tax sólo regulaba la transcripción a través de la formación de complejos con factores de transcripción estabilizando dímeros y la unión de éstos con elementos reguladores, se ha demostrado que dicha proteína posee un dominio que le permite también interactuar directamente con el ADN proviral (74). Su interacción con proteínas celulares, en su mayoría implicadas en la regulación del ciclo celular, resulta en una desregulación mitótica con la subsecuente expansión clonal de la célula infectada, siendo éste uno de los mecanismos de replicación descritos en el HTLV-1 (Figura 8).

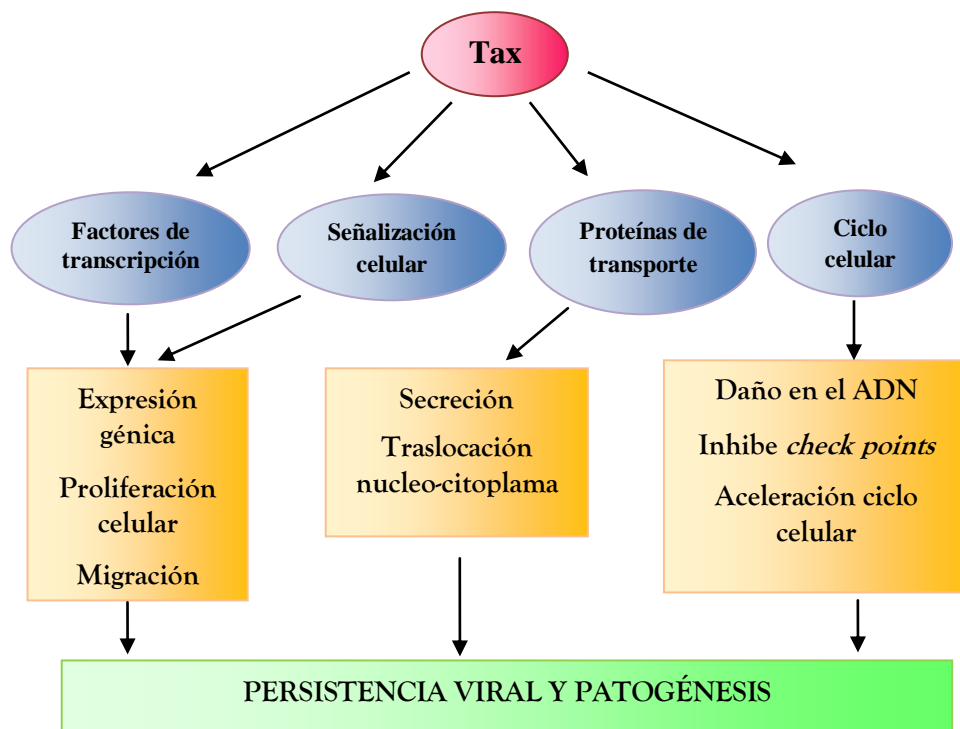


Figura 8. Mecanismos celulares en los cuales interviene la proteína Tax. Adaptado de Boxus *et al.*, 2008

✚ La proteína **Rex** (p27), factor clave del transporte de ARN viral, actúa post-transcripcionalmente en el núcleo regulando la expresión de los genes virales. Interviene en el pasaje de ARN no clivado o del ARN viral con un evento de *splicing* hacia el citoplasma y en la inhibición de la expresión de los ARNs doblemente clivados, favoreciendo la síntesis de proteínas virales estructurales. Junto con Tax, orquestan la expresión temporal de los genes del HTLV-1 y la transformación celular. Además, disminuye tanto su propia expresión como la de Tax al actuar directamente sobre la secuencia RRE (del inglés *Rex Responsive Element*) situada en LTR (75).

✚ La proteína **HBZ** (del inglés *HTLV-1 basic Leucine Zipper*), actúa como un regulador negativo de la transactivación viral mediada por Tax, a través de su heterodimerización con los factores CREB, CREB2 y CBP/p300 entre otros. Además

modula la señalización mediada por AP-1 interactuando con c-Jun, JunB y JunD. Interactúa con el proteosoma favoreciendo la degradación de factores celulares en ausencia de ubiquitinación y activa la proliferación de linfocitos T por interacción con el factor E2F1 (76).

#### 10.4 PROTEÍNAS ACCESORIAS

Recientemente, se ha demostrado el rol esencial de estas proteínas en relación al ciclo de vida del virus, la infectividad, regulación de la transcripción génica de la célula huésped y en la patogénesis de la infección.

✚ La proteína **p12** se ubica en las membranas del retículo endoplásmico y en el *cis*-Golgi. Se une con la forma inmadura de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I), interfiriendo en su interacción con la  $\beta$ 2-microglobulina, y disminuyendo su expresión en la célula infectada. La misma origina una proteína de 8Kd generada por clivaje proteolítico que se ubica en la membrana celular cerca del receptor de las células T (TCR) en el contexto de la sinapsis inmunológica, disminuyendo la expresión del mismo. Es así como las múltiples funciones de p12 la implicarían en el escape del virus de la vigilancia inmunológica del huésped y en la proliferación de las células T (77).

✚ La proteína **p30** está involucrada en la retención nuclear de los ARNm *tax/rex* llevando a la inhibición de la expresión viral y al establecimiento de la latencia. Además, p30 modula la expresión de genes celulares involucrados en la activación de las células T, apoptosis y regulación del ciclo celular a través de la

formación del complejo p300/CBP/TIP60. Una forma truncada de p30, denominada p13, se localiza en la mitocondria alterando el potencial de membrana y la producción de las especies reactivas del oxígeno (78).

✚ La proteína **p21**, una forma truncada de Rex que conserva la secuencia de exportación nuclear pero carece de la de localización nuclear, regula las funciones de ésta incluyendo su translocación entre el núcleo y el citoplasma. Se cree que p21 sería capaz de competir con Rex por los ARNm virales que no experimentan o que sufren sólo un evento de *splicing*, facilitando su acumulación en el núcleo (79).

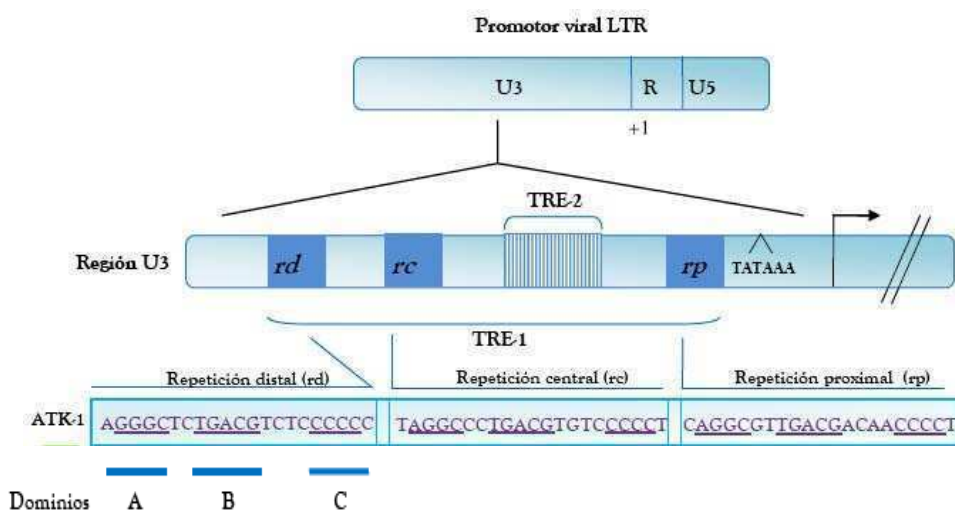
## 10.5 REGIONES REGULATORIAS NO CODIFICANTES

Los LTRs son secuencias no codificantes compuestas cada una por 3 regiones denominadas U3, R y U5. Cada LTR constituye un componente integral siendo esencial para la retrotranscripción e integración del genoma viral (provirus) y regulación de la transcripción.

✚ La región U3 está implicada en la regulación de la expresión génica, en particular en la terminación y poliadenilación de los ARNm virales y es la que determina en parte la permisividad en la célula huésped. Esta región posee la *TATA box* y 3 repeticiones imperfectas de 21pb, altamente conservadas en todos los HTLVs, denominadas colectivamente **TRE-1**. Los mismos son sitios de regulación *in cis* a través de los cuales Tax, ya sea directa (mediante el contacto con el ADN) o indirectamente (por formación de complejos con factores de transcripción celulares) controla casi la totalidad de los procesos implicados en la transcripción y replicación

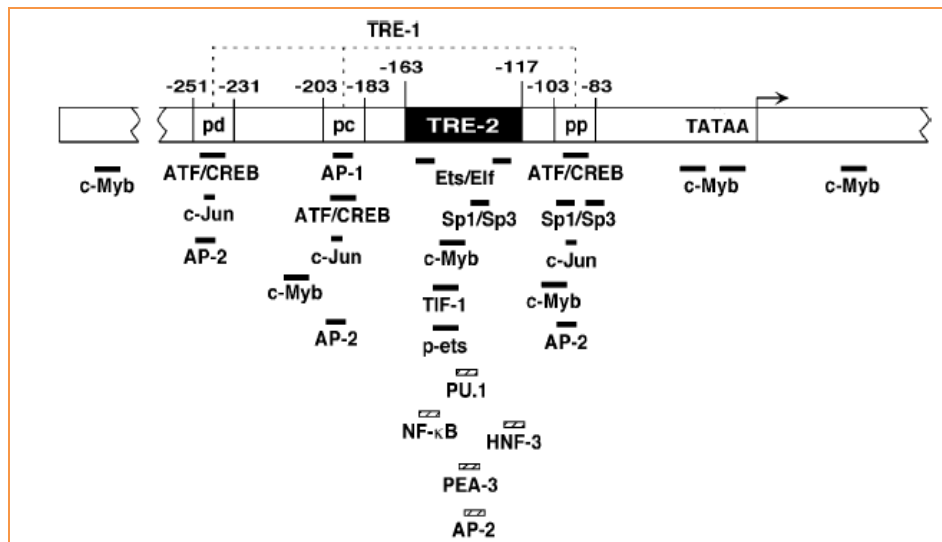


viral. Cada repetición se denomina repetición distal (*rd*), central (*rc*) y proximal (*rp*), respectivamente, en referencia a su ubicación respecto del sitio de comienzo de la transcripción. A su vez, cada repetición contiene tres dominios conservados (A, B y C), siendo el B el más importante respecto a la regulación mediada por Tax. En éste se encuentran los primeros cinco nucleótidos del elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE); el cual es conocido por reclutar a factores celulares de la familia ATF/CREB. El dominio B media la transactivación por Tax ya sea en combinación con el dominio A ó C (80). Cada promotor presenta una zona rica en nucleótidos C/G (junto al sitio de unión ATF/CREB) en la que Tax se une directamente al ADN. Así, la interacción Tax/ATF/CREB/TRE-1 es clave en los procesos regulatorios mediados por Tax. Si bien los TRE-1 son similares en su secuencia nucleotídica, ensayos de mutagénesis *in vitro* demostraron que no son funcionalmente equivalentes, siendo la presencia y secuencia nucleotídica de los mismos crítica para la regulación mediada por Tax (81) (Figura 9).



**Figura 9. Estructura del LTR.** La transcripción se regula principalmente a partir del elemento de respuesta a Tax denominado TRE-1, el cual se compone de tres repeticiones: distal (*rd*), central (*rc*) y proximal (*rp*). Adaptado de Grant *et al.*, 2002

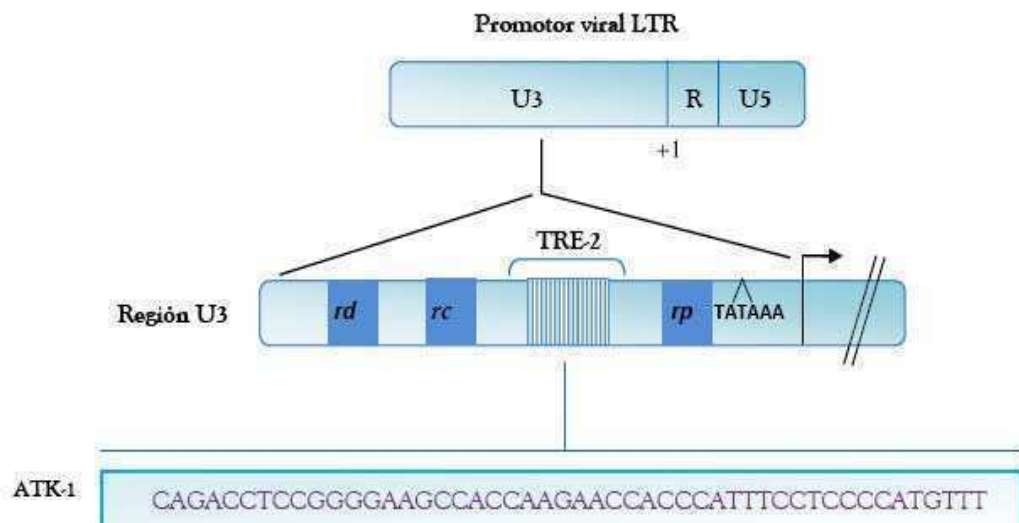
Un gran número de reguladores transcripcionales de origen celular se unen a las repeticiones rd, rc y rp. Algunos de ellos, lo hacen indistintamente como ocurre con AP-2, mientras que otros se unen específicamente a una de ellas. Por ejemplo AP-1, c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, y JunD interaccionan sólo con el rc, mientras que los factores Sp1/Sp3 se unen específicamente al rp (80) (Figura 10).



**Figura 10.** Sitios de unión de factores de transcripción en la región U3 del LTR. Las barras negras indican los sitios de unión de factores en el promotor viral, descriptos y cuya interacción ha sido demostrada a través de ensayos de *footprinting* y de cambios de la movilidad electroforética. Las barras punteadas indican los potenciales sitios de interacción obtenidos a través del análisis de secuencia. Adaptado de Grant *et al.*, 2002.

La transcripción del HTLV-1 también depende de un segundo elemento regulador ubicado en la región U3, localizado entre las repeticiones central y proximal, el cual se denomina **TRE-2**. Se ha demostrado *in vitro* que varios factores de transcripción se unen a este elemento, como Sp1/Sp3, Ets-1, Ets-2, Elf-1, p-ets, TIF-1 y c-Myb; y mediante análisis de secuencia del TRE-2 se ha propuesto que

NF- $\kappa$ B, AP-2, PU.1, NHF-3 y PEA-3 también interactuarían con él (80, 82) (Figura 11).



**Figura 11. Estructura del LTR y elemento TRE-2.** Se esquematiza el elemento único de respuesta a Tax tipo 2 (TRE-2), ubicado en la región U3, que junto con TRE-1 constituyen los principales sitios de interacción con la proteína viral Tax. Adaptado de Grant *et al.*, 2002.

Las regiones R y U5 contienen el sitio de iniciación de la transcripción, de poliadenilación y la mayor parte de la secuencia implicada en la formación de la estructura RRE de respuesta a la proteína Rex. Ambas contienen dominios de unión al factor de transcripción Sp1 implicados en la regulación de la transcripción independiente de la secuencia *TATA box* (83).

## 11. CICLO DE REPLICACIÓN Y PERSISTENCIA VIRAL

Una vez que el virus ingresa a la célula, se produce la transcripción reversa del ARN viral en ADN, se genera el ADN doble cadena y ocurre la integración del mismo en el genoma de la célula huésped (provirus). Todos estos procesos se realizan en la ausencia de expresión génica *de novo*, dirigidos por proteínas estructurales y enzimas del virión. En relación al sitio de integración, se ha descrito una preferencia por zonas ricas en nucleótidos GC, en particular cercanas a regiones genómicas que contienen genes involucrados en el ciclo celular y en la transducción de señales de la célula huésped, las cuales coinciden con regiones de cromatina activa (84, 85). Luego, utilizando la maquinaria de transcripción génica y de síntesis de proteínas de la célula hospedadora se completa la expresión de proteína, replicación del ARN genómico y ensamble de las partículas virales (Figura 12).

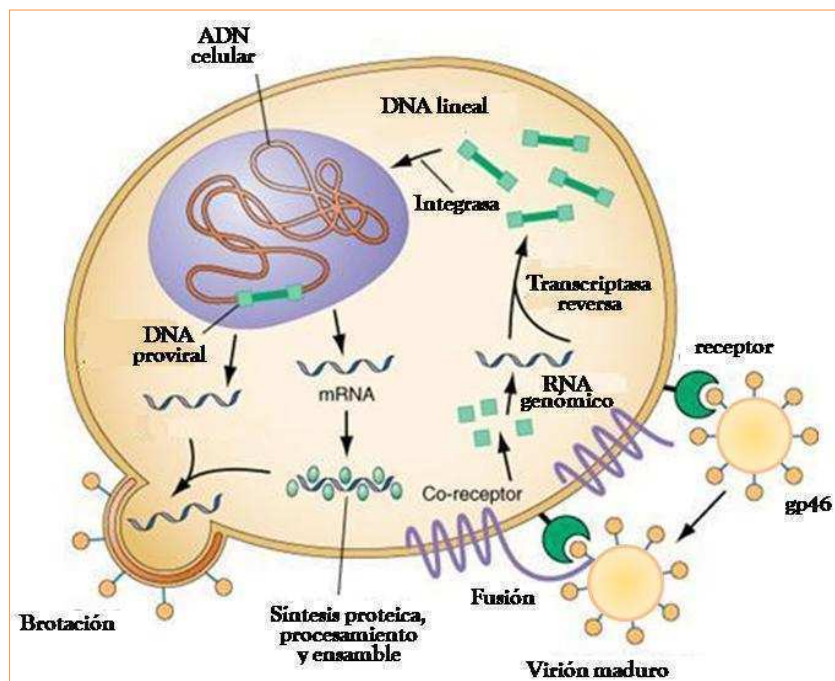


Figura 12. Ciclo de replicación.

La transcripción del provirus es iniciada por la maquinaria celular y factores virales que son reclutados hacia el LTR, a partir del cual se producen los ARNm (sentido o antisentido) que darán origen a las proteínas estructurales codificadas por los genes principales (*gag*, *pol* y *env*) y a las proteínas accesorias. El mecanismo de control de la transcripción puede convertir la replicación viral de altamente estimulada en infección latente.

En relación al tropismo viral, el HTLV-1 infecta preferencialmente los CD4+, aunque también en menor frecuencia linfocitos CD8+ y células dendríticas, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos B, células de la glía, astrocitos, células de la microglía, oligodendrocitos y neuronas. Este hecho sugeriría la presencia de un receptor celular y/o co-receptores de expresión ubicua. Así, se ha propuesto a la proteína GLUT1, transportador de glucosa presente en distintos tipos celulares, como el receptor del HTLV-1. Además, se han detectado otras moléculas como la neuropilina (NRP1) y proteoglicanos de heparán-sulfato (HSPGs) que serían requeridos junto con GLUT1 para el ingreso eficiente del virus (86, 87).

Se ha descrito un mecanismo de infección denominado sinapsis viral, el cual comprende contacto célula-célula, polarización del centro organizador de los microtúbulos (MTOC) formación de sinapsis y liberación de viriones en espacios extracelulares confinados a la sinapsis virológica entre una célula infectada y sin infectar. Estos eventos están mediados por la proteína viral Tax que interviene en la reestructuración interna del MTOC. Se ha demostrado que los linfocitos infectados

con HTLV-1 presentan partículas virales adheridas a la cara externa de la membrana plasmática e inmersas en componentes de la matriz celular, similar a los *biofilms* bacterianos, a partir de la cual infectarían otra célula blanco (88-90). Además, la proteína Tax está involucrada en la desregulación del proceso mitótico de la célula infectada induciendo su expansión clonal y la replicación viral. Este mecanismo junto con la sinapsis viral, posibilita una baja exposición viral a los anticuerpos neutralizantes favoreciendo una infección persistente. Por otro lado, esta forma replicativa impacta en la baja variabilidad genética observada en los HTLVs, la cual es menor que la de otros retrovirus humanos como el HIV, ya que permite replicar el genoma sin utilizar la enzima TR la cual introduce mutaciones en alta frecuencia (88).

## 12. VARIABILIDAD GENÓMICA Y PATOGENIA

Si bien la mayoría de los individuos infectados por HTLV-1 permanecen asintomáticos durante toda su vida, se ha sugerido un contexto multifactorial que involucraría características virales (genómicas) y del hospedador (genéticas e inmunes), las cuales determinarían el establecimiento de la patogénesis viral y el desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección. Sin embargo, las contribuciones relativas de cada una de ellas todavía no han sido completamente dilucidadas.

En particular, considerando los factores virales, son los elementos reguladores de la transcripción y replicación viral presentes en el LTR los que juegan un rol clave en la permisividad de una célula infectada. Por otro lado, la proteína viral Tax,

fuertemente ligada a la génesis de la HAM/TSP y ATL, ha sido descripta como un factor viral crítico con respecto a la activación genómica y la expresión génica viral, a través de su interacción con factores de transcripción celular y la región LTR proviral, implicada además, en la transformación celular (91). Y si bien, varios estudios se han enfocado en la identificación de polimorfismos virales neuropatogénicos o leucemogénicos, aún no se ha encontrado una asociación al respecto.

### **12.1. REGIÓN LTR**

El estudio de las regiones TRE-1 y 2, ha evidenciado la presencia de mutaciones que podrían impactar en la replicación y en la transcripción proviral, sugiriendo posibles implicancias en el desarrollo de las patologías asociadas a la infección por HTLV-1. Además, la comparación de secuencias LTR provenientes de portadores asintomáticos y pacientes con HAM/TSP, ha demostrado que existe un 95% de homología de secuencias, detectándose la mayor variabilidad en la región U3 del LTR, la cual presenta los sitios de transactivación mediada por Tax (92). Así, las interacciones entre factores celulares, la proteína Tax y la región LTR son claves en la regulación de la transcripción viral, permitiendo la salida del estado de latencia viral y el establecimiento de la transcripción activa. Mutaciones en estas secuencias pueden afectar dramáticamente el reclutamiento de factores de transcripción, impactando en la expresión génica viral. En relación a los elementos TRE-1 y TRE-2, se encuentran presentes en los cuatro tipos de HTLVs siendo su secuencia altamente conservada (93), lo cual sustenta la importancia reguladora de dichas secuencias. Además,

ensayos de mutagénesis *in vitro* demostraron que los mismos no son funcionalmente equivalentes, siendo la presencia y secuencia nucleotídica crítica para la regulación mediada por Tax (80).

## 12.2. VARIANTES DE LA PROTEÍNA TAX

La proteína Tax, codificada por la región  $pX$  del HTLV-1, es un determinante clave en la persistencia y en la patogénesis de la infección, habiéndose demostrado su interacción con más de 100 dianas celulares (71). Así, en relación a la patogénesis se han realizado estudios entre los cuales se ha reportado la presencia de provirus defectivos en el gen Tax en el SNC de pacientes con HAM/TSP, sugiriendo un rol de estas mutantes en la génesis de HAM/TSP (94). Por otro lado, se han descrito mutantes de escape de Tax durante el desarrollo de ATL, los cuales presentan un codón de terminación (95). Por otro lado, el análisis filogenético de secuencias provenientes de pacientes con HAM/TSP, ha revelado 2 polimorfismos de genes Tax A y Tax B con diferente polimorfismo, ambos pertenecientes al subgrupo Transcontinental A, observándose a Tax A con una mayor incidencia en pacientes japoneses con HAM/TSP que con ATL y portadores asintomáticos (96). En relación al alelo Tax A, en nuestro país, un estudio que incluyó 16 individuos infectados del noroeste detectó una variabilidad menor en pacientes con HAM/TSP que en portadores asintomáticos sin hallarse asociación con el estado clínico y sugieren que la baja diversidad observada en la secuencia de Tax sería la consecuencia de una selección positiva para la conservación de la proteína en este grupo (97).





## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la epidemiología de la infección por HTLV-1 en distintas comunidades originarias del Norte de Argentina y analizar la filogenia y variabilidad genética de las cepas circulantes en éstas y en residentes de Buenos Aires, considerando el componente étnico de los individuos infectados.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 1. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.1. Determinar la prevalencia y caracterizar epidemiológicamente la infección por HTLV-1 en cinco comunidades originarias que habitan las provincias de Jujuy (*Kolla*), San Juan (Sagua-Huarpe), Misiones (Mbyá-Guaraní), Chaco y Formosa (Wichis).

1.2. Estudiar la presencia de infección por HTLV-2, HIV-1 y *Treponema pallidum* en las comunidades descriptas.

### 2. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS

2.1. Realizar el análisis filogenético de los genotipos HTLV-1 obtenidos en comunidades originarias y residentes de la ciudad y provincia de Buenos Aires.

### 3. ESTUDIOS DE ETNICIDAD

3.1. Estudiar el componente étnico autóctono y alóctono en individuos originarios y en residentes de la ciudad y provincia de Buenos Aires infectados por HTLV-1 mediante la caracterización de haplogrupos de ADN mitocondrial.

#### 4. VARIABILIDAD GENOMICA

4.1. Estudiar la presencia de mutaciones nucleotídicas en elementos reguladores transcripcionales TRE-1 y TRE-2 del promotor viral LTR.

4.2. Analizar la presencia de mutaciones no sinónimas en la secuencia del gen Tax.



## ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 1. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR HTLV-1

#### 1.1. Población estudiada

Se realizó un estudio de corte transversal en cuatro comunidades originarias de Argentina, incluyendo los grupos étnicos *Kolla* (Jujuy), *Sagua-Huarpe* (San Juan), *Wichi* (Formosa y Chaco) y *Mbyá-Guaraní* (Misiones). Geográficamente, la primera se situó en la ciudad de Abra Pampa a 215 km de San Salvador de Jujuy; la segunda en la localidad de Las Lagunas y Villa Media Agua, a 50 km de la capital Sanjuanina; la tercera en la ciudad de Puerto Iguazú; y por último las comunidades *Wichi* se ubicaron en la localidad de Laguna Yema a 380 km de Formosa Capital y en el impenetrable, a 300 km de la ciudad de Resistencia, Chaco.

#### 1.2. Consideraciones éticas

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Independiente de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (IRB#00004817) y el Comité Independiente de Ética de NEXO AC (IRB0005349). Se mantuvo la confidencialidad de toda la información según pautas de la legislación nacional e internacional vigentes. Se siguieron estrictamente las pautas éticas internacionales relacionadas con los estudios epidemiológicos y clínicos (Pautas Internacionales para la Evaluación Ética de los Estudios Epidemiológicos, CIOMS, Ginebra, 1991).

### **1.3. Reclutamiento de individuos**

En la comunidad de Jujuy, a través de una comunicación radial se convocó voluntariamente a los individuos que quisieran formar parte del estudio, mientras que en el resto de las comunidades se mantuvo una reunión inicial con cada cacique, quien informó posteriormente a su comunidad. En ambos casos, un profesional del área de la salud explicó detenidamente los objetivos y alcances del proyecto. Se trabajó con un equipo multidisciplinario que incluyó a bioquímicos, médicos, biólogos, personal técnico y personal de apoyo. Se invitó a los interesados en participar a firmar un formulario de consentimiento informado, del cual se les entregó una copia. Como criterio de inclusión se consideró que fueran individuos mayores de 18 años, que aceptaran voluntariamente participar del estudio y que firmaran el consentimiento informado.

### **1.4. Obtención de datos epidemiológicos**

Se completó un cuestionario estandarizado en una entrevista personal y privada, considerando la presencia de antecedentes de riesgo para la infección por HTLV-1: haber nacido o residir en área endémica para la infección; padres oriundos de un área endémica, presentar sintomatología asociada a algunas de las enfermedades causadas por el HTLV-1, antecedentes familiares de las mismas, haber sido transfundido antes o después del 2005 (año en que se establece la obligatoriedad del tamizaje en bancos de sangre de Argentina), uso de drogas inyectables o diagnóstico previo de alguna infección de transmisión sexual (ITSs). Por otro lado, se obtuvo información acerca

de la edad, género, cantidad de hijos, haber sido amamantado en la infancia y conocimiento de la infección por HTLV-1.

## **1.5. Obtención de la muestra y procesamiento**

### **1.5.1. Obtención de Plasma**

A partir de una muestra de 10 ml de sangre entera anticoagulada con 125µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%, se recuperó el plasma por centrifugación a 1900rpm por 10 minutos, conservándose luego a -20°C. Además, se guardó sangre entera anticoagulada a -20 °C para la posterior obtención de ADN.

### **1.5.2. Obtención de ADN**

El ADN se extrajo a partir de sangre entera utilizando un equipo comercial (Qiagen, DNA extraction kit, QIAGEN, Hilden, Germany) y se cuantificó por espectrofotometría. Para evaluar la calidad del ADN extraído, se empleó una reacción de PCR amplificando un fragmento de 523pb del gen celular de la β-actina (oligonucleótidos descritos en la tabla 1). La mezcla de reacción fue de 5µl de buffer 5X; 0,5µl de dNTPs 10mM; 0,5µl de oligonucleótidos 10µM; 0,1µl de Go Taq DNA Polimerasa (Promega) 5U/µl; 17,4µl de agua libre de DNasa y RNasa y 1,5µl de ADN 0,1 µg/ul. Las condiciones del ciclado fueron: 94°C 5 minutos; 25 ciclos de 95°C 30 segundos, 50°C 30 segundos y 72°C 30 segundos; y extensión final de 72°C 5 minutos. Se incluyó un control positivo (muestra β-actina positiva por PCR) y agua libre de DNasa y RNasa como control de contaminación.

El producto se sometió a una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con 5ul de bromuro de etidio (10 mg/ml), se sembró 5ul del producto y se corrió el gel a

100 volts durante 45 minutos en buffer solución de tris-borato-EDTA (TBE) 1X. El gel se visualizó con un transiluminador UV, comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas). Sólo las muestras positivas para el gen de  $\beta$ -actina fueron incluidas en los estudios moleculares de HTLV y ADNmt. Aquellas que resultaron negativas se procesaron nuevamente incluida la extracción de ADN, excluyéndose del estudio los casos en que el resultado final fue nuevamente negativo.

## **1.6. Diagnóstico de infecciones**

Todos los ensayos que se detallan a continuación y la interpretación de los resultados, fueron realizados siguiendo estrictamente las instrucciones provistas por los fabricantes.

### **1.6.1. Infección por HTLV-1/2**

El tamizaje de anticuerpos específicos se realizó por aglutinación de partículas (AP) (Serodia, Fujirebio) y las muestras reactivas por una o ambas técnicas se confirmaron por WB (HTLV Blot 2.4 Genelabs Diagnostics). En los casos en que el WB resultó HTLV no tipificado o indeterminado, se empleó una nested-PCR (n-PCR) específica con fines confirmatorios para amplificar 198pb y 159pb para los genes *pol* y *tax* del HTLV-1 y 138pb y 128pb para los genes *pol* y *tax* del HTLV-2, respectivamente.

La mezcla de reacción para el gen *pol* del HTLV-1 y HTLV-2 en la primera ronda fue de: 5 $\mu$ l de buffer 10X; 0,5 $\mu$ l de dNTPs 10mM; 0,5 $\mu$ l de oligonucleótidos 10 $\mu$ M, 0,125 $\mu$ l de Go Taq DNA Polimerasa (Promega) 5U/ $\mu$ l; 14,9 $\mu$ l de agua y 4 $\mu$ l de ADN



0,1 µg/µl, con un volumen de reacción de 25µl. El ciclado empleado fue: 94°C 5 minutos; 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C 30 segundos; y una extensión final de 72°C 7 minutos. La mezcla de la segunda ronda fue igual a la primera, excepto por la utilización de 16,9µl de agua y 2µl de producto de amplificación de la primera ronda.

Para el gen *tax* del HTLV-1 y HTLV-2, la mezcla de reacción en la primera y segunda ronda fue similar a la descrita para *pol*, a excepción de los oligonucleótidos utilizados, con una temperatura de *annealing* de 50°C en ambos ciclados (98, 99). Las secuencias de los oligonucleótidos para ambos genes se detallan en la tabla 1.

Se sembraron 5µl del producto en un gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de etidio, cuyas condiciones fueron las mismas que las empleadas en el caso del gen de la β-actina, pero con un tiempo de corrida de 30 minutos. Las reacciones de n-PCR se realizaron en un termociclador *EPPENDORF Mastercycler gradient* (al igual que todas las descritas en esta tesis).

Como controles positivos se utilizaron una línea celular linfocitaria persistentemente infectada con HTLV-1 (MT2) y una muestra HTLV-1 positiva (perfil completo de WB); agua libre de DNasas y RNasas como control de contaminación, como controles negativos ADN de una línea celular linfocitaria no infectada (H9) y de una muestra negativa por WB; y 1 muestra HTLV-1 ó HTLV-2 según corresponda, confirmada por WB como control de especificidad.

Se consideró una muestra positiva por n-PCR cuando se obtuvo amplificación de ambos genes (*tax* y *pol*) para un tipo viral específico; indeterminada cuando se

amplificó uno de los dos genes y negativa cuando no amplificó para ninguno de los genes.

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial de los genes virales *pol* y *tax* y del gen celular de la  $\beta$ -actina.**

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Gen-Virus
Primera ronda		
SK110-I	CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G	<i>pol</i> - HTLV-1
SK110-II	CCA TAC AAC CCC ACC AGC TCA G	<i>pol</i> - HTLV-2
SK111-I	GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT	<i>pol</i> - HTLV-1
SK111-II	GTG GTG GAT TTG CCA TCG GGT TTT	<i>pol</i> - HTLV-2
SK43-I	CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT	<i>tax</i> - HTLV-1
SK43-II	TGG ATA CCC CGT CTA CGT GT	<i>tax</i> - HTLV-2
SK44-I	GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG	<i>tax</i> - HTLV-1
SK44-II	CAG CTG ACA ACG CGT CCA TCG	<i>tax</i> - HTLV-2
Segunda ronda		
POL1.1	TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC	<i>pol</i> - HTLV-1
POL3.1	TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG	<i>pol</i> - HTLV-1
POL1.2	CCT GGT CGA GAG AAC CAA TGG TG	<i>pol</i> - HTLV-2
POL 3.2	CCA CTG GGG TTC ATG ACA TTT AGC	<i>pol</i> - HTLV-2
<i>Inner sense</i> 43/44	GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA	<i>tax</i> - HTLV-1/2
<i>Inner antisense</i> 43/44	CCA TCG ATG GGG TCC CA	<i>tax</i> - HTLV-1/2
gen de la $\beta$ -actina		
$\beta$ 1-actina	GGA CCT GAC TGA CTA CCT CAT GAA	~
$\beta$ 2-actina	GAT CCA CAT CTG CTG GAA GGT GG	~

### **1.6.2. Infección por HIV-1**

La detección de anticuerpos específicos se realizó mediante la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) (HIV-1/2 ELISA Dade Behring; Enzygnost anti HIV ½ plus) y AP (SFD HIV ½ PA, Biorad Fujirebio) y las muestras reactivas para alguna de las dos técnicas se confirmaron por WB (New Lab Blot-1, Bio-Rad).

### **1.6.3. Infección por *T. pallidum***

La detección de anticuerpos se realizó mediante el test de VDRL (Wiener Lab.) y por hemoaglutinación (TPHA Biosystems), confirmando las muestras reactivas, ya sea para una o ambas pruebas por inmunofluorescencia (FTA-abs Immunofluorescence Biocientífica SA).

## **1.7. Análisis estadístico**

Se confeccionaron planillas con los datos obtenidos utilizando el programa SPSS, versión 11.5.0, 2002, Chicago, IL, USA; conformando las bases de datos que fueron posteriormente analizadas. El análisis estadístico se realizó con el mismo programa. En todos los casos, los valores de prevalencia se calcularon como la proporción de positivos confirmados en toda la población testada. Los intervalos con un 95% de confianza (IC 95%) fueron calculados asumiendo una distribución binomial. Para comparar proporciones se utilizaron tanto las pruebas de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Todos los valores de  $p$  computados hasta un nivel de 0.05 fueron reportados como medidas de significancia estadística.

## ESTUDIOS MOLECULARES

### 2. FILOGENIA DEL HTLV-1

#### 2.1. Muestras analizadas

Se obtuvo material para análisis filogenético a partir de 85 muestras HTLV-1  $\beta$ -actina positivas. Parte de las mismas fueron obtenidas del estudio de prevalencia realizado en las comunidades originarias, y parte de otras poblaciones de Buenos Aires cuya prevalencia de infección por HTLV-1 ha sido previamente reportada por nuestro grupo (57).

Se incluyeron:

a. Muestras de individuos originarios (n=10) de la comunidad *Kolla* de Jujuy, reclutados en el estudio de prevalencia realizado en el presente trabajo de tesis.

b. Muestras de individuos con conducta de riesgo (n=16), incluyendo UDIs (IDUs, n=7), HSH (MSM, n=3), TS (FSW, n=6), los cuales no presentaron sintomatología asociada a la infección por HTLV-1 al momento de realizarse el estudio (58-61).

c. Muestras derivadas al Centro Nacional de Referencia para el SIDA (CNRS) para diagnóstico de la infección por HTLV-1 (n=35) provenientes de donantes de sangre (BD) voluntarios de servicios de hemoterapia de la ciudad y provincia de Buenos Aires.

d. Muestras derivadas al CNRS para diagnóstico de la infección por HTLV-1 (n=20), provenientes de servicios de hematología y neurología de la ciudad y provincia

de Buenos Aires, las cuales pertenecieron a pacientes con diagnóstico confirmado de ATL (n=4) y HAM/TSP (n=16).

e. Familiares (FL) directos de personas HTLV-1 diagnosticadas en el CNRS (n=4).

En el caso de individuos residentes de Buenos Aires (b-e), se recopiló retrospectivamente información acerca de la edad, género, lugar de nacimiento, lugares de residencia y antecedentes de riesgo para la infección por HTLV-1 (ya descriptos para comunidades originarias).

## **2.2. Región genómica analizada**

Se estudió la región promotora LTR del HTLV-1, la cual es conocida por presentar el mayor índice de variabilidad con respecto a otras regiones provirales. En ambos casos se utilizó la enzima Platinum®Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen) cuyas propiedades le confieren 6 veces más fidelidad de copia respecto a la Taq Polimerasa común.

Se amplificaron 561pb de la región LTR mediante una reacción de hemi-nPCR (h-n-PCR). La mezcla de reacción de la primera ronda fue de 2,5µl de buffer 10X; 0,5µl de dNTPs 10mM; 1µl de oligonucleótidos 10µM; 1µl de MgSO<sub>4</sub> 50mM; 0,1µl de Polimerasa 5U/µl (Invitrogen); 17,9µl de agua libre de DNasa y RNasa y 2µl de ADN 0,1 µg/µl, con un volumen final de 25µl. Las condiciones de la segunda ronda fueron las mismas, excepto por 16,9µl de agua libre de DNasa y RNasa y 1µl del producto de primera ronda. El ciclado de ambas rondas fue: 2 minutos a 94°C, 35 ciclos con 95°C 15 segundos, 55,5°C 30 segundos y 68°C 50 segundos; con una

extensión final de 10 minutos a 68°C. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la tabla 2 (100).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de la región LTR del HTLV-1.**

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	región-ronda
8200LA	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	LTR- 1° y 2°
3VEXT	CGC AGT CAG GAG GCA CCR M	LTR- 1°
3VINT	GAA CGC RAC TCA ACC GGC RYG GAT GG	LTR- 2°

### 2.3. Reacción de secuenciación y edición de las secuencias

El producto de amplificación se secuenció directamente en un secuenciador automático (ABi Prism 3100 Genetic Analyzer) abarcando doble marco de lectura. La mezcla de reacción se preparó utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied BioSystems), la cual se compuso de 1µl de BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix; 1,5µl de 5X Sequencing Buffer; 5,5µl de agua libre de DNasa y RNasa, 1µl de oligonucleótidos 4µM y 1µl del amplicón. Los oligonucleótidos empleados fueron los mismos que los utilizados en la segunda ronda de amplificación del LTR (tabla 2). El ciclado: desnaturalización inicial a 96°C 5 minutos, luego 24 ciclos de 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos, 60°C 4 minutos y extensión final de 60°C 5 minutos. El producto precipitado y resuspendido en formamida de alta pureza fue secuenciado. Los cromatogramas se editaron utilizando el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Co, USA). Se utilizó la secuencia prototipo ATK-1 (número de acceso del GeneBank J02029) para fijar las posiciones genómicas y establecer los sitios con mutaciones, obteniendo finalmente la secuencia editada.

## 2.4. Análisis filogenético

La matriz de datos se construyó alineando las secuencias editadas junto con secuencias de referencia de Argentina, Perú, Chile y Brasil (países que presentan altas tasas de migración a nuestro país) y de Guyana Francesa, Surinam, y países de Asia y África (con focos endémicos para la infección por HTLV-1). Se utilizó el programa Bioedit versión 7.0.5.3 (101). Se realizó la optimización manual del alineamiento, obteniéndose la matriz final de datos a analizar posteriormente por los métodos de Neighbour Joining (NJ), Parsimonia (P) y Máxima Probabilidad (ML), usando los programas PAUP\*, TNT y PHYML, respectivamente (102-104). Sólo cuando el tamaño de la matriz de datos lo permitió, se empleó el análisis Bayesiano (BY) con el programa Mr Bayes (105). Se aplicó un análisis de *bootstrap* en cada caso para evaluar el sustento de las topologías obtenidas en cada caso.

## 2.5. Análisis estadístico del clado divergente

### 2.5.1. Test de Shimodaira-Hasegahua

Dado que el análisis filogenético evidenció la presencia de un clado divergente con alto soporte estadístico, se testeó la hipótesis de la existencia de un nuevo subgrupo. Con el objetivo de clasificar las secuencias divergentes, se procedió según se describe a continuación.

Se construyó una matriz de datos incluyendo las secuencias divergentes, referencias representativas de los cuatro subtipos mayoritarios y cinco subgrupos del subtipo Cosmopolita. A partir de la misma, se obtuvo un árbol filogenético por el método de ML. Luego, se modificó la matriz de partida en su forma parentética, repitiendo la reconstrucción filogenética con una restricción impuesta a priori, en la que las secuencias divergentes agruparan dentro del subgrupo A y por otro lado, con la restricción de que las mismas agruparan dentro del subgrupo B, obteniéndose los árboles óptimos respectivos por el método de ML.

Finalmente, se compararon las probabilidades asociadas a cada una de las topologías óptimas, mediante el test de Shimodaira-Hasegahua (Programa PAUP 4.0), considerándose una medida de significancia estadística a todo valor de  $p$  computado hasta un nivel de 0.05.



### 2.5.2. Análisis de similitud

Se compararon las secuencias de las muestras “divergentes” y las referencias incluidas en el análisis, con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el análisis filogenético y en el test de Shimodaira Hasegahua. Así, si las secuencias divergentes constituyen un nuevo subgrupo, el índice de similitud (IS) entre ellas debería ser similar al obtenido con secuencias pertenecientes a los subgrupos ya descritos.

Se construyó una matriz con 198 secuencias, incluyendo las 119 empleadas en el análisis filogenético. Se incrementó el número de referencias representativas para cada subgrupo, a excepción del subgrupo E, del cual sólo se han descrito dos secuencias al presente. Se obtuvo el promedio de sustituciones nucleotídicas (IS) entre todos los pares de secuencias pertenecientes a cada subgrupo (intra-subgrupo) o entre las secuencias de un subgrupo dado con respecto a todas las secuencias de los otros subgrupos (inter-subgrupo). Los algoritmos implementados para la realización del análisis de similitud se encuentran en un *script* descrito en el *R Statistical Package Language* (<http://www.R-project.org>).

### **3. ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL (ADN mt)**

#### **3.1. Población estudiada**

Se incluyeron todas las muestras de nativos originarios HTLV-1 positivos (n=9) y residentes de Buenos Aires (n=75), que pertenecieron a individuos no emparentados por la línea materna, cuyas muestras fueron  $\beta$ -actina positivas.

#### **3.2. Región analizada**

Se estudió la región control completa no codificante del ADN mitocondrial humano, centrando el análisis de las mutaciones entre las posiciones 16024 a 572 de la secuencia de referencia rCRS (número de acceso GenBank NC\_012920).

#### **3.3. Amplificación por PCR**

Se amplificaron 1340pb las cuales abarcaron la región control completa del genoma mitocondrial. El templado utilizado fue el ADN extraído que se empleó en la reacción de amplificación para  $\beta$ -actina. La mezcla de reacción consistió de 2,5 $\mu$ l de buffer 10X; 0,5 $\mu$ l de dNTPs 10mM; 1 $\mu$ l de oligonucleótidos 10 $\mu$ M; 1 $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 50mM; 0,1 $\mu$ l de ADN Polimerasa 5U/ $\mu$ l (Invitrogen); 12,9  $\mu$ l de agua libre de DNasa y RNasa y 7 $\mu$ l de ADN 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l, siendo el volumen final de reacción de 25 $\mu$ l. El ciclado fue de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos con 94°C 1 minuto, 56°C 1 minuto y 68°C 1,5 minutos; con una extensión final de 10 minutos a 68°C. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 3.

Se sembraron 5 $\mu$ l del producto en un gel de agarosa 1%, teñido con Bromuro de Etidio y la electroforesis se realizó a 100 volts por 1.5 horas en buffer TBE 1X. El

gel se visualizó en un transiluminador UV. Se empleó un marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas) para detección de la banda de interés.

Se utilizó un control positivo (muestra positiva caracterizada previamente por PCR para la región control de ADNmt) y un control de contaminación (agua libre de DNasa y RNasa).

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de la región control completa del ADN mitocondrial.**

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Reacción
F15878	AAA TGG GCC TGT CCT TGT AG	Amplificación Secuenciación
F16475	TAG CTA AAG TGA ACT GTA TCC	Amplificación Secuenciación
B649	TTT GTT TAT GGG GTG ATG TGA	Secuenciación
B16	TGA TAG ACC TGT GAT CCA TCG TGA	Secuenciación

### 3.3. Reacción de secuenciación y detección de mutaciones diagnósticas

El producto de amplificación se secuenció directamente en un secuenciador automático (ABi Prism 3100 Genetic Analyzer), abarcando doble marco de lectura. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 3. Las condiciones de la reacción de secuenciación y el kit empleado fueron los mismos que se describen en la sección 2.3. Las secuencias obtenidas se alinearon con la versión modificada de la secuencia de referencia rCRS utilizando el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Co, USA). Las secuencias se analizaron independientemente por dos operadores. Una confirmación final de los resultados obtenidos se llevó a cabo realizando un control de calidad *a posteriori*, por comparación con base de datos publicados de

orígenes étnicos/geográficos similares. Como herramienta clasificatoria de los haplogrupos se utilizó un árbol filogenético disponible online (<http://www.phylotree.org>) y una herramienta de clasificación basada en el mismo árbol filogenético, denominada Haplogrep (106).

## ESTUDIOS DE VARIABILIDAD.

### 4. ANÁLISIS GENÓMICO

#### 4.1. Muestras estudiadas

Se incluyeron 85 muestras HTLV-1 positivas pertenecientes a individuos originarios (n=10) y a residentes de Buenos Aires (n=75) que resultaron  $\beta$ -actina positiva.

#### 4.2. Región LTR: elementos de respuesta a Tax (TRE-1 y TRE-2)

Se analizaron las tres repeticiones que integran el TRE-1: distal (rd), central (rc) y proximal (rp) y el elemento TRE-2, todas ubicadas en la región U3 del LTR.

##### 4.2.1. Detección de mutaciones

Se realizó un alineamiento de las secuencias LTR con el programa Bioedit versión 7.0.5.3 incluyendo la secuencia prototipo ATK-1, la cual se utilizó para fijar las posiciones nucleotídicas y determinar la presencia de mutaciones.

##### 4.2.2. Amplificación por PCR de la región LTR completa

Se amplificaron 768pb de la región LTR mediante una reacción de h-nPCR. La mezcla de reacción de la primera ronda consistió en 2,5 $\mu$ l de buffer 10X; 0,5 $\mu$ l de dNTPs 10mM; 1 $\mu$ l de oligonucleótidos 10 $\mu$ M; 1 $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 50mM; 0,1 $\mu$ l de ADN Polimerasa 5U/ $\mu$ l (Invitrogen); 16,9 $\mu$ l de agua y 2 $\mu$ l de ADN 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l, siendo el volumen final de reacción de 25 $\mu$ l. Las condiciones de la segunda ronda fueron las mismas, excepto por 17,9 $\mu$ l de agua y 1 $\mu$ l del producto de amplificación de la primera ronda. El ciclado para ambas rondas fue el mismo: 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de

95°C 15 segundos, 58°C 30 segundos y 68°C 50 segundos; con una extensión final de 10 minutos a 68°C. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de la región LTR completa del HTLV-1.**

Oligos	Secuencia 5'-3'	Reacción	Ronda
8200LA	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	Amplificación	1°
R2	GTG CTA TAG GAT GGG CTG TCG C	Amplif/Secuenc	1° y 2°
3VINT	GAA CGC RAC TCA ACC GGC RYG GAT GG	Amplificación	2°
3LTRf	TCC CCA TTT CTC TAT TTT TAA CG	Amplif/Secuenc	2°

El producto de amplificación se sembró en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, realizándose una electroforesis según las condiciones descritas en la sección 1.4. El gel se visualizó en un transiluminador y la banda de interés se purificó a partir del gel (ADN Puriprep-GP Kit, InbioHighway).

#### 4.3. Proteína Tax: mutaciones no sinónimas en dominios funcionales

Se alinearon secuencias de referencia pertenecientes al mismo subgrupo que las muestras caracterizadas en este estudio y se diseñaron oligonucleótidos específicos que hibridaron en las zonas conservadas para amplificar la secuencia codificante de la proteína Tax. Se amplificó un fragmento de 1058pb a través de una hn-PCR. La mezcla de reacción para la primera ronda de amplificación fue de 2,5 µl de buffer 10x; 0,5µl de dNTPs 10mM; 1µl de oligonucleótidos 10µM; 1µl de SO<sub>4</sub>Mg 50mM; 0,1µl de DNA Polimerasa 5U/µl (Invitrogen); 17,9µl de agua libre de DNAsa y RNAsa y 2µl de ADN 0,1 µg/µl, siendo el volumen final de reacción de 25µl. Para la segunda ronda de amplificación se utilizaron las mismas cantidades excepto por 1µl

de templado de la primera ronda y 18,9µl de agua libre de DNasa y RNasa. Las condiciones del ciclado en la primera ronda fueron de 94°C 2 min, 35 ciclos de 94°C 15 seg, 55°C 30 seg, 68°C 3 min y una extensión final 68°C 10 min. Para la segunda ronda fueron de 94°C 2 min, 30 ciclos de 94°C 15 seg, 58°C 30 seg, 68°C 1,5 min y extensión final 68°C 10 min. Los oligonucleótidos se detallan en la tabla 5. El producto de amplificación se visualizó con el mismo procedimiento descrito en la sección 3.2. Se realizó la secuenciación directa de las muestras positivas abarcando doble marco de lectura (condiciones descritas en la sección 2). Las secuencias se editaron con el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Co, USA). Se realizó un alineamiento con el programa Bioedit versión 7.0.5.3, incluyendo las secuencias editadas junto con la secuencia de Tax prototipo (ATK-1), la cual se utilizó para fijar las posiciones nucleotídicas y establecer los sitios que presentaron mutaciones. Las secuencias nucleotídicas editadas se tradujeron a secuencias aminoacídicas, evaluándose la presencia de mutaciones no sinónimas en las mismas. Se determinaron las mutaciones no sinónimas en los dominios funcionales ya descritos para la proteína Tax (71).

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de la secuencia codificante de la proteína Tax.**

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Reacción	Ronda
HFL75	GCTATAGTCTCCTCCCCCTGC	Amplificación	1º
3VINT	GAACGCRACTCAACCGGCRYG GATGG	Amplificación	1º
TaxF	ATGGCCCACTTCCCAGGGTT	Amplificación Secuenciación	2º
TaxR	TCAGACTTCTGTTTCTCGGA	Amplificación Secuenciación	2º







## ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 1. PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR HTLV-1 Y DETECCIÓN DE OTRAS INFECCIONES EN COMUNIDADES ORIGINARIAS

#### 1.1. Infección por HTLV-1

El diagnóstico de infección por HTLV-1 se realizó en 611 muestras, incluyendo 112 provenientes de la comunidad *Kolla* de Jujuy; 78 de la comunidad Sagua-Huarpe de San Juan; 202 de la comunidad Mbyá-Guaraní de Misiones; 38 de la comunidad Wichi de Formosa y 181 de la comunidad Wichi de Chaco. Del total, 11 muestras resultaron positivas y 1 seroindeterminada por WB, confirmándose negativa por n-PCR. La prevalencia final de infección fue de 1,8% (11/611) (IC 95%: 0,66-2,94), mientras que el mismo dato estratificado por comunidad originaria mostró un valor de 9,8% (11/112) (IC 95%: 3,9-15,8) en la comunidad *Kolla* de Jujuy. No se detectaron individuos infectados por HTLV-1 en el resto de las comunidades.

#### 1.2. Otras infecciones

El diagnóstico de otras infecciones reveló la presencia de un caso HTLV-2 positivo con un valor de prevalencia final de 0,16% (1/611) (IC 95%: 0,004-0,91) mientras que el mismo valor estratificado por comunidad originaria mostró un valor de 0,6% (1/181) (IC 95%: 0,01-3,04) en la comunidad Wichi de Chaco. La muestra positiva perteneció a una mujer de 23 años, quien no reportó antecedentes de riesgo para la infección por HTLV-1/2. Además, se demostró la

presencia de infección por *T. pallidum* en todas las comunidades con cifras de prevalencia que variaron de 0,6% (1/181) (IC 95%: 3,5-7,3) a 9,8% (1/112) (IC 95%: 3,9-15,8), las cuales fueron similares entre la comunidad *Kolla*, Mbyá-Guaraní, Sagua-Huarpe y Wichi de Formosa; y mayores respecto a la de Chaco ( $p < 0,05$ ). Dos muestras pertenecientes a la comunidad *Kolla* presentaron coinfección HTLV-1/*T. pallidum*. No se detectó infección por HIV-1 en los 611 individuos estudiados (Tabla 6).

**Tabla 6. Prevalencia de la infección por HTLV-1, HTLV-2 y *T. pallidum* en las cinco comunidades originarias estudiadas (N=611).**

Comunidad originaria	HTLV-1			<i>T. pallidum</i>			HTLV-2		
	casos	%	IC 95%	casos	%	IC 95%	casos	%	IC 95%
<i>Kolla</i> (n=112)	11	9,8	3,9-15,8	11	9,8	3,9-15,8	0	-	-
Sagua-Huarpe (n=78)	0	-	-	1	1,3	0,03-6,9	0	-	-
Mbyá-Guaraní (n=202)	0	-	-	17	8,4	4,3-12,5	0	-	-
Wichi Formosa (n=38)	0	-	-	3	7,9	1,7-21,4	0	-	-
Wichi Chaco (n=181)	0	-	-	1	0,6	0,01-3,04	1	0,6	0,01-3,04
Total (N=611)	11	1,8	0,66-2,94	33	5,4	3,5-7,3	1	0,16	0,004-0,91

### 1.3. Características epidemiológicas de los grupos estudiados

A continuación se describe la composición etaria y la proporción de individuos masculinos y femeninos en cada una de las comunidades originarias incluidas en el estudio (Tabla 7).

**Tabla 7. Edad y sexo de los individuos pertenecientes a las cinco comunidades originarias incluidas en el estudio (N=611).**

Datos Epidemiológicos	Kolla n=112	Sagua-Huarpe n=78	Mbyá-Guaraní n=220	Wichi	
				Formosa n=38	Chaco n=181
Edad <sup>1</sup>	48	40	27	31.5	34
RIC <sup>2</sup> 25-75	33,3-58,8	31,3-55,3	21-39	26-37,3	26-45
Femenino %	83	73	55	61	58
Masculino %	17	27	45	39	42

<sup>1</sup>Se calculó como la mediana de la edad de los individuos estudiados.

<sup>2</sup>RIC: Rango inter-cuartil 25-75.

De los 611 participantes incluidos, aquellos pertenecientes a la comunidad *Kolla* residían en un área endémica de infección para HTLV-1 ya conocida. En todas las comunidades se reportaron antecedentes previos de transfusión: 12 casos en la comunidad *Kolla*, 9 en la comunidad *Sagua-Huarpe*, 21 en la comunidad *Mbyá-Guaraní*, 3 en la comunidad *Wichi* de *Formosa* y 22 en la de *Chaco*. En relación al uso de drogas ilegales, se detectó un caso en la comunidad *Mbyá-Guaraní* de *Misiones*. Además, 5 individuos *Kolla* reportaron antecedentes familiares de neuropatías y uno antecedentes de leucemia. Los 611 participantes reportaron haber sido amamantados y sólo 7 de ellos (pertenecientes a la comunidad *Kolla*) manifestaron conocimiento previo acerca de la infección por HTLV-1.

Considerando a los 11 individuos originarios HTLV-1 positivos, 8 fueron mujeres y 3 hombres, siendo la mediana de la edad de 51 años (RIC 25-75: 33.8-59.8). Todos reportaron como lugar de nacimiento distintas ciudades o pueblos de

la Puna Jujeña, en la provincia de Jujuy. Ninguno reportó transfusiones previas. Una mujer de 49 años presentó dificultad para caminar y antecedentes familiares neurológicos. Dos muestras (Jujuy78 y Jujuy79) pertenecieron a dos hermanas (Tabla 8).

**Tabla 8. Datos epidemiológicos de los individuos originarios HTLV-1 positivos pertenecientes a la comunidad *Kolla* (n=11).**

Muestra	Sexo	Edad	Lugar de nacimiento	Sintomatología	Antecedentes familiares
Jujuy20	F	49	Agua Caliente	Dificultad para caminar	Neurológicos
Jujuy37	M	58	Abra Pampa	no	no
Jujuy43	M	48	Puerta de Potrero	no	no
Jujuy47	F	59	Tabladitas	no	no
Jujuy49 <sup>1</sup>	M	80	Puerta de Potrero	no	no
Jujuy68	F	60	Abra Pampa	no	no
Jujuy73	F	63	Casabindo	no	no
Jujuy74	F	52	Miraflores	no	no
Jujuy77	F	50	Rinconada	no	no
Jujuy78	F	29	Cienaga Grande	no	no
Jujuy79	F	19	Mina Pirquitas	no	no

<sup>1</sup>muestra  $\beta$ -actina negativa, excluida de los estudios moleculares.

## ESTUDIOS MOLECULARES

### 2. CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE CEPAS HTLV-1 DETECTADAS EN BUENOS AIRES Y EN JUJUY.

#### 2.1. Residentes de Buenos Aires

Se incluyeron un total de 75 muestras HTLV-1 positivas, provenientes de individuos residentes de la ciudad y provincia de Buenos Aires, 16 de ellas reclutadas en estudios previos realizados en grupos en riesgo de infección (7UDIs, 3MSM y 6FSW) y 59 provenientes de individuos previamente diagnosticados en nuestro laboratorio los cuales provenían de servicios de hemoterapia (35 BD), 16 de centros de neurología (Neu) y 4 de hematología (ATL). Además, se incluyeron 4 individuos familiares de personas infectadas por HTLV-1 (FL).

El análisis retrospectivo de los datos epidemiológicos reveló que la mediana de la edad fue de 37 años (RIC 25-75: 29-51), siendo 43 (57.3%) de ellos mujeres y 32 (42.7%) hombres. En relación a los antecedentes de riesgo para la infección por HTLV-1, 14 individuos eran nacidos en áreas endémicas (8 en Perú, 2 en Paraguay, 1 en Brasil, 1 en Bolivia y 2 en Salta) y uno de ascendencia Japonesa. Un individuo presentó antecedente materno de ATL. Además dos participantes reportaron historia de transfusión. Considerando la presencia de otras infecciones, se registraron 18 casos HIV-1 positivos, 5 casos de infección por *T. pallidum* y uno de infección por HTLV-2.

Entre los individuos estudiados, se incluyó una familia (familia 1) conformada por el padre, sin antecedente de riesgo para la infección, quien fue diagnosticado en un banco de sangre de Buenos Aires (BD18) y cuya esposa e hijo acudieron para

detección de infección por HTLV-1 a nuestro laboratorio. La mujer era nacida en Perú (FL1) y había amamantado a su hijo varón (FL2) por un año. Estos datos sugieren muy probablemente transmisión horizontal y vertical, respectivamente. Se evidenció otro caso (familia 2), de una pareja oriunda de la ciudad de Salta, en la cual la mujer desarrolló una ATL (ATL3) y cuyo esposo fue derivado para diagnóstico de infección (FL3). Además, se incluyeron dos hermanas (familia 3) nacidas en Perú, ambas con HAM/TSP (Neu2 y Neu6) cuya madre era HTLV-1 positiva; y por último, un individuo masculino (FL4) nacido en Salvador de Bahía, Brasil, quien fue diagnosticado por haber muerto su madre de una ATL (familia 4) (Figura 13).

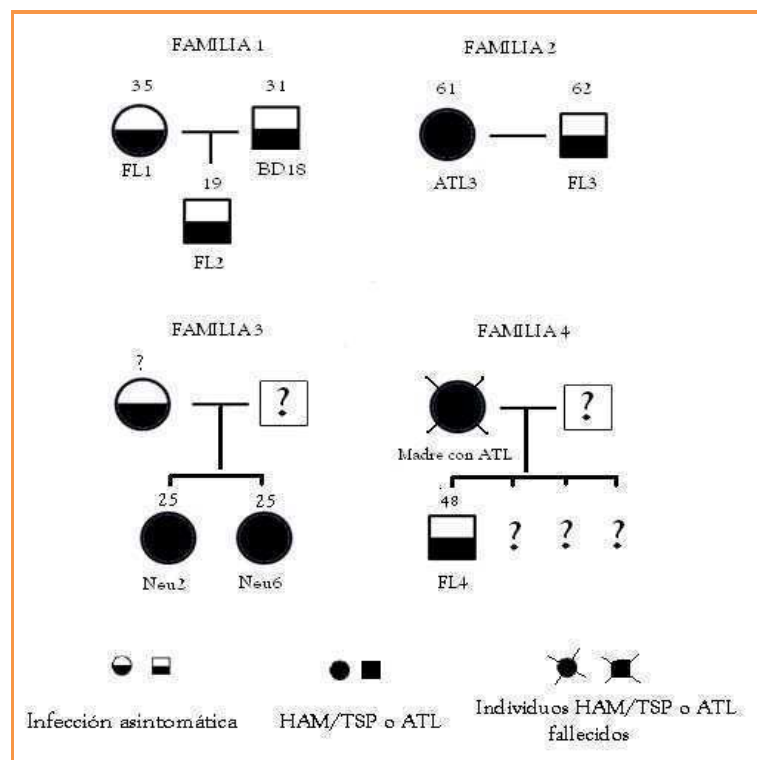


Figura 13. *Pedigree* de cuatro familias que poseen individuos infectados por HTLV-1 incluidos en el estudio. Los círculos indican individuos femeninos y los cuadrados masculinos. Se muestra la edad de los mismos y el nombre asignado a la muestra.

De las 75 muestras incluidas, se amplificó la región LTR de 73 de ellas, mientras que dos (BD18 y BD25) resultaron negativas por n-PCR. Inicialmente, se analizaron 44 secuencias HTLV-1 junto con 75 referencias disponibles en el GeneBank, elegidas por su proveniencia geográfica (países Sudamericanos con altas tasas de migración a Argentina) y las representativas de los subtipos y subgrupos conocidos, conformando una matriz optimizada de 492pb. La matriz se analizó por NJ y ML, obteniendo en ambos los resultados que a continuación se detallan (sólo se muestra el árbol de ML) (Figura 14).

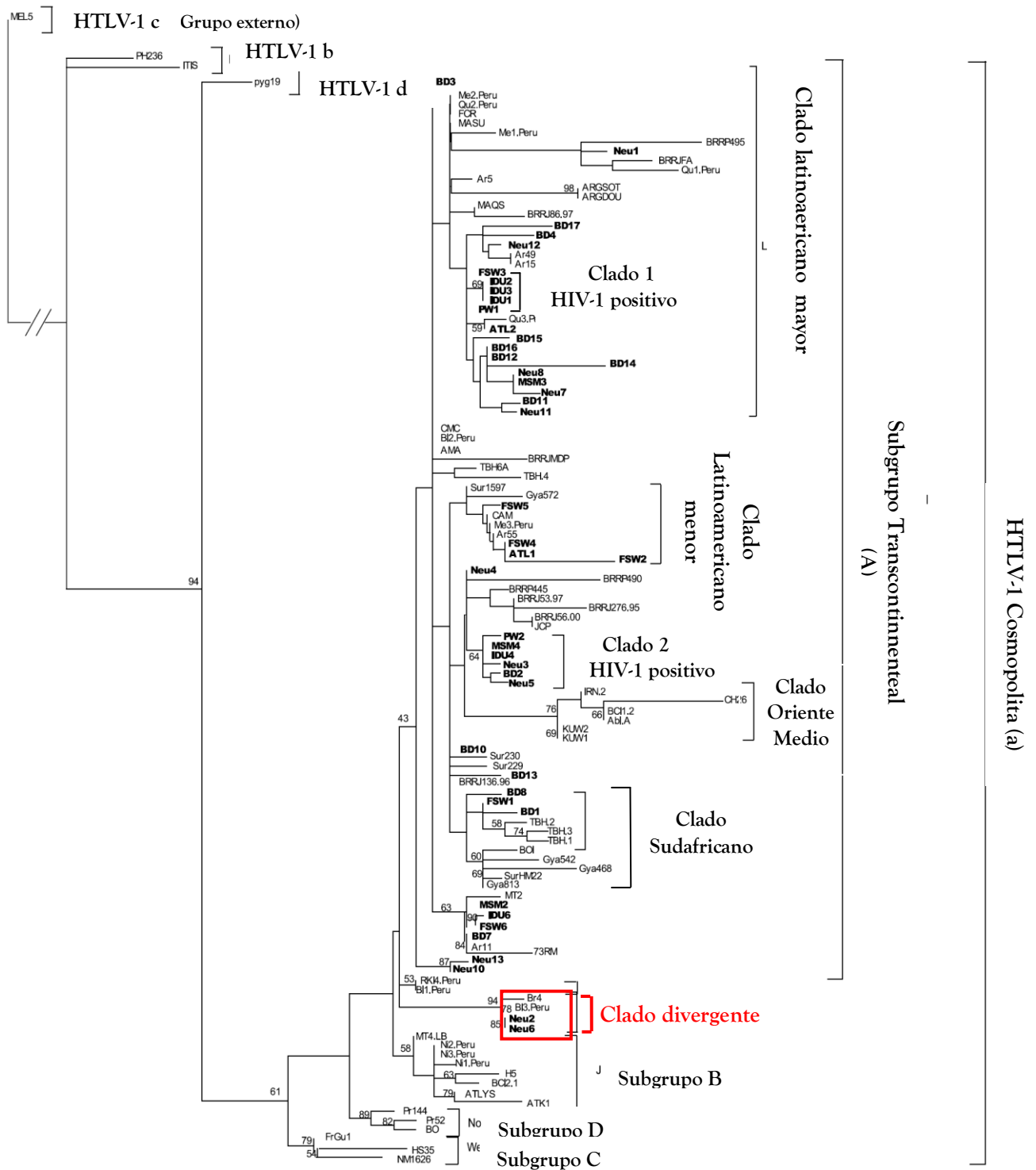
El análisis filogenético permitió detectar los subtipos a-d y dentro del subtipo a (Cosmopolita) se distinguieron los 5 subgrupos A-E. Las 44 secuencias HTLV-1 se incluyeron dentro del subtipo Cosmopolita (a) (ML, 61% *bootstrap*), siendo 42 de ellas clasificadas como subgrupo Transcontinental (A). Dentro de este subgrupo, 24 secuencias agruparon en 2 *clusters* Latinoamericanos previamente descriptos: 20 en el **clado Latinoamericano Mayor** (que también incluyó referencias de amerindios de Argentina, Perú y Brasil) y 4 en el **clado Latinoamericano Menor** (con referencias de nativos de Surinam, Guyana, Perú y Argentina). Además, se observó un grupo denominado **clado Sudafricano**, que incluyó 3 secuencias pertenecientes a dos individuos residentes de Buenos Aires sin antecedentes de riesgo (BD1 y BD8) y a una mujer trabajadora sexual (FSW1) nacida en Perú, y referencias de Sudáfrica, Guyana y Surinam. Se detectaron 3 secuencias (IDU1-3) pertenecientes a individuos coinfectados HIV-1/HTLV-1 que agruparon más cercanas entre sí dentro de un clado monofilético (**clado 1 HIV-1 positivo**), incluido en el grupo Latinoamericano Mayor y



otras 6 secuencias también pertenecientes a individuos residentes de Buenos Aires coinfectados, que se ubicaron por fuera del mismo (**clado 2 HIV-1 positivo**) (PW2, MSM4, IDU4, Neu3, BD2, Neu5). Las 9 secuencias restantes se distribuyeron a lo largo del árbol sin incluirse en algún clado particular.

Por fuera del subgrupo Transcontinental, dos secuencias (Neu2 y Neu6), provenientes de 2 mujeres peruanas con HAM/TSP, formaron un grupo monofilético el cual a su vez incluyó a una referencia de Brasil (Br4) y otra de Perú (Bl3), ambas provenientes de individuos descendientes de raza negra (20, 107). Dicho clado (designado *Clado divergente*) se ubicó por fuera de todos los subgrupos de HTLV-1 previamente descritos (ML, 94% *bootstrap*) (Figura 14).

A partir de la matriz optimizada se calculó el porcentaje de similitud entre las secuencias estudiadas y las referencias representativas de cada subtipo, siendo este valor mayor respecto al subtipo Cosmopolita (a) (97,5%; IC 95%: 97,4-97,7), y disminuyendo respecto al subtipo d (95,7%; IC 95%: 95,6-95,8), b (93,2%; IC 95%: 93.0-93.3) y c (89.4%; IC 95%: 89.2-89.6), confirmando los datos obtenidos en la topología del árbol filogenético. Los valores obtenidos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Árbol filogenético obtenido por ML a partir del análisis de 492pb de la región LTR del HTLV-1. Se incluyeron 119 secuencias de referencia y 44 secuencias estudiadas (letra oscura). El clado divergente se muestra en rojo. La referencia MEL5 fue usada como grupo externo. Los números indican el soporte de cada nodo.

## 2.2. Comunidad *Kolla*

En una segunda etapa, se caracterizaron filogenéticamente 10 secuencias de la región LTR detectadas en los estudios epidemiológicos en la comunidad *Kolla*. Se obtuvo una matriz optimizada de 401pb en la que se incluyeron las 10 secuencias de individuos *Kollas* de Jujuy, 81 referencias elegidas según el mismo criterio descrito en la sección 2.2. y 15 de las secuencias de residentes de Buenos Aires previamente analizadas (5 de ellas provenientes de individuos nacidos en Perú, Bolivia y Salta; y el resto de individuos nacidos en Buenos Aires). Los datos se analizaron por tres métodos diferentes, NJ, ML y análisis Bayesiano (BY), confirmando en todos ellos los resultados que a continuación se detallan (sólo se muestra árbol obtenido por BY).

El análisis filogenético permitió detectar los subtipos a-d y dentro del subtipo a (Cosmopolita) se distinguieron los 5 subgrupos A-E. Las 10 secuencias HTLV-1 de Jujuy se clasificaron como subtipo Cosmopolita (a) ( $p=0,82$ ), subgrupo Transcontinental (A) las que a su vez se ubicaron dentro del **clado Latinoamericano Mayor**, conformado por referencias de origen amerindio de distintos países sudamericanos y en el cual se detectaron las 15 secuencias de Buenos Aires, resultado consistente con el descrito en el punto 2.1.

Del total de secuencias de Jujuy, 8 (Jujuy20, Jujuy43, Jujuy68, Jujuy73, Jujuy74, Jujuy77-79Jujuy) se ubicaron más cercanas entre sí en un grupo monofilético (**subcluster 1**) que incluyó dos referencias (Ar15 y Ar49) provenientes de nativos de la región del Noroeste argentino ( $p=0.68$ ). A su vez, 4 de ellas conformaron un **subcluster 2** con alto soporte estadístico ( $p=0.98$ ) que incluyó las secuencias obtenidas

de dos hermanas (Jujuy78 y Jujuy79). Se detectaron 2 secuencias (Jujuy37 y Jujuy47) por fuera del **subcluster 1** que se ubicaron cercanas a 5 referencias de Buenos Aires (Neu1, Neu11, PW1, BD12 y FSW3) provenientes de individuos nacidos en Bolivia y Salta; Brasil y Perú (provenientes de nativos Quechuas) ( $p=0.82$ ). También se confirmó la presencia del **clado divergente** hallado en el análisis del punto 2.1 (Figura 15).

El porcentaje de similitud entre las secuencias estudiadas y las referencias representativas de cada subtipo fue mayor respecto al subtipo Cosmopolita a (96,96,5%; IC 95%: 96,4-97), y disminuyendo respecto al subtipo d (95,2%; IC 95%: 95-95,4), e (94,2%, IC 95% 94-94,4), f (93,3%, IC 95% 93, 93,6%), b (93,2%; IC 95%: 93.0-93.4) y c (90.9%; IC 95%: 90.6-91.2), confirmando los datos obtenidos en la topología del árbol filogenético. Los valores obtenidos fueron significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).

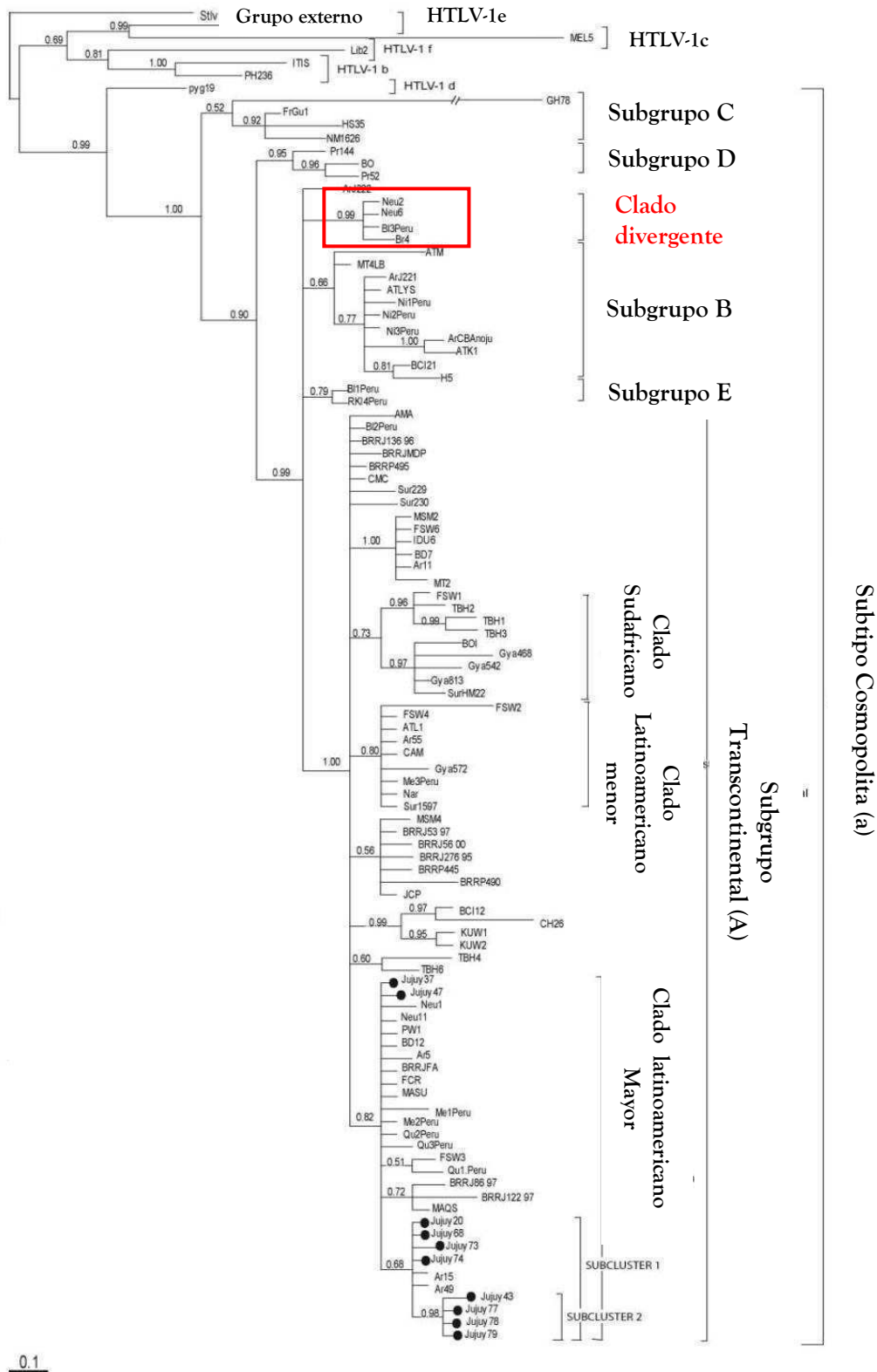


Figura 15. Árbol filogenético obtenido por el método BY de 401pb de la región LTR. Se incluyeron 96 referencias y 10 secuencias de la comunidad Kolla. Los números indican las probabilidades *a posteriori*. Las secuencias estudiadas se representan por puntos negros. En rojo se muestra al clado divergente.

### 2.3. Análisis filogenético de las secuencias LTR provenientes de individuos residentes de Buenos Aires y de originarios *Kolla* de Jujuy.

Se realizó un análisis final cuya matriz de datos incluyó las 54 secuencias analizadas en los puntos 2.1 y 2.2, incorporando 29 secuencias provenientes de residentes de Buenos Aires y completando un total de 83 secuencias LTR.

La matriz resultante de 491pb se analizó por NJ, ML y Parsimonia (P) confirmando en los tres casos los resultados que a continuación se detallan (sólo se muestra árbol de ML). Las 83 secuencias fueron clasificadas como subtipo Cosmopolita (a), 81 de ellas subgrupo Transcontinental (A) y las dos restantes se ubicaron por fuera de todos los subgrupos del HTLV-1 conocidos, confirmando nuevamente la existencia del **clado divergente** (ML, 93% *bootstrap*). En relación al subgrupo Transcontinental, 28 secuencias de residentes de Buenos Aires y las 10 de individuos *Kollas* se incluyeron en el **clado Latinoamericano Mayor**, y se confirmó la presencia del **subcluster 1** compuesto por las 8 secuencias *Kollas* que además incluyó 4 secuencias provenientes de individuos residentes de Buenos Aires (Neu12, BD23, BD4 y BD27) las cuales no presentaron antecedente de nacimiento o residencia en un área endémica. Una de ellas (BD27), a su vez, se incluyó en el **subcluster 2**. Dentro del clado Latinoamericano Mayor, se confirmó la presencia del **Clado 1 HIV-1 positivo** (Figura 16).

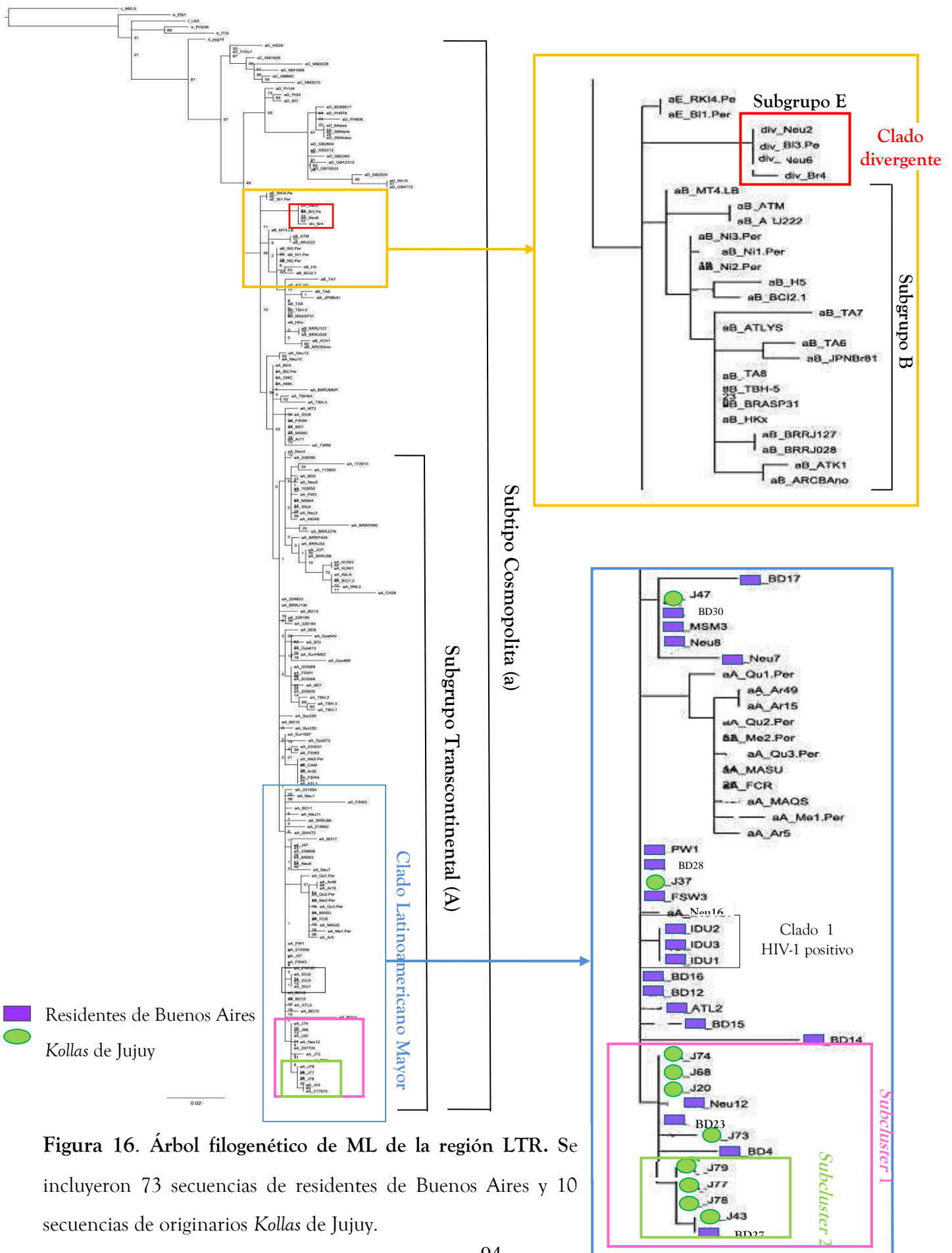


Figura 16. Árbol filogenético de ML de la región LTR. Se incluyeron 73 secuencias de residentes de Buenos Aires y 10 secuencias de originarios *Kollas* de Jujuy.

Por otro lado, 4 secuencias (BD32, FSW4, FSW5 y ATL1) agruparon dentro del **clado Latinoamericano Menor**, 3 de ellas provenientes de individuos nacidos en Buenos Aires y una en Salta; y otras 6 (FL1, FSW1, FL2, BD1, BD8 y BD21) en el **clado Sudafricano**, 3 de ellas provenientes de residentes de Buenos Aires nacidos en Perú y el resto en Buenos Aires; incluyendo ambos clados referencias provenientes de amerindios descendientes de africanos (Guyana y Surinam) y de individuos Sudafricanos.

Por fuera de todos los *clusters* anteriormente mencionados, se confirmó la presencia del **Clado 2 HIV-1 positivo**, el cual incluyó 10 secuencias de residentes de Buenos Aires, 8 de ellas provenientes de individuos coinfectados HIV-1/HTLV-1 (dos de ellas UDIs). Las restantes 23 secuencias de residentes de Buenos Aires se ubicaron dispersas a lo largo del árbol filogenético junto con referencias de Brasil y Perú (Figura 17).

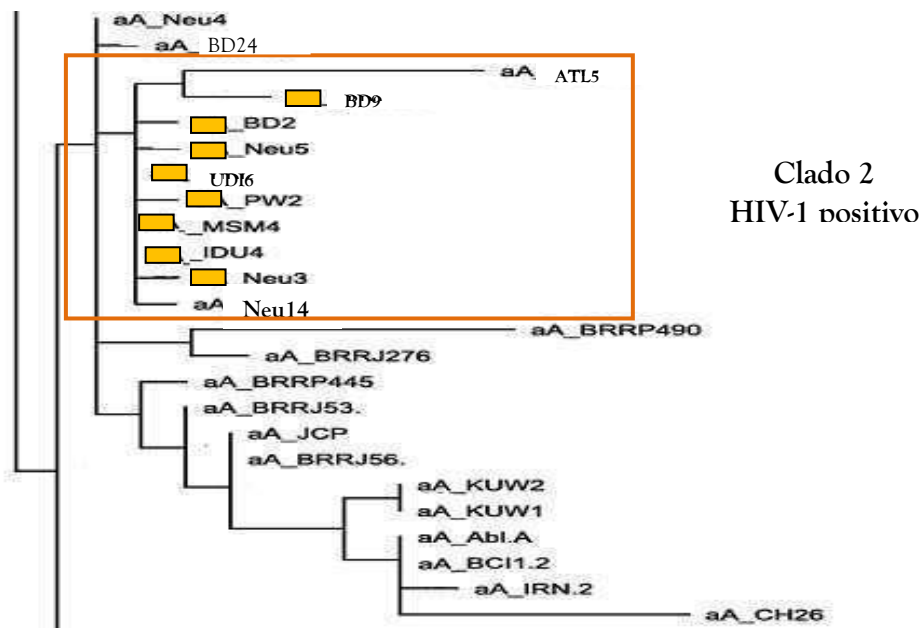
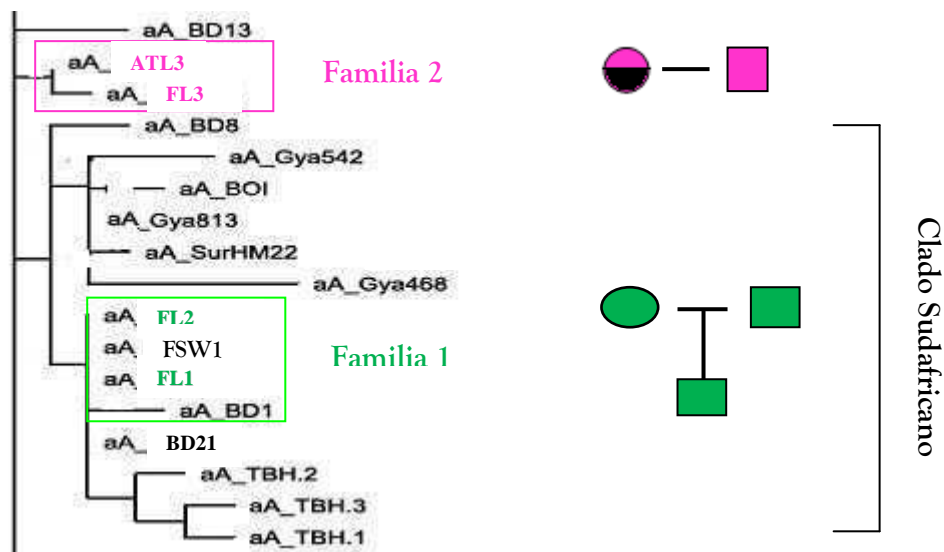


Figura 17. Sección ampliada de la figura 16, en la que se muestra el Clado 2 HIV-1 positivo (naranja).



Considerando las secuencias que pertenecieron a individuos emparentados descritos en la sección 2.1, dos de ellos incluidos en la familia 1, la madre (FL1) y el hijo (FL2), se ubicaron dentro del **clado Sudafricano** y las pertenecientes a la familia 2 (FL3 y ATL3) se ubicaron monofiléticas entre sí pero no incluidas dentro de ningún clado descrito (Figura 18).



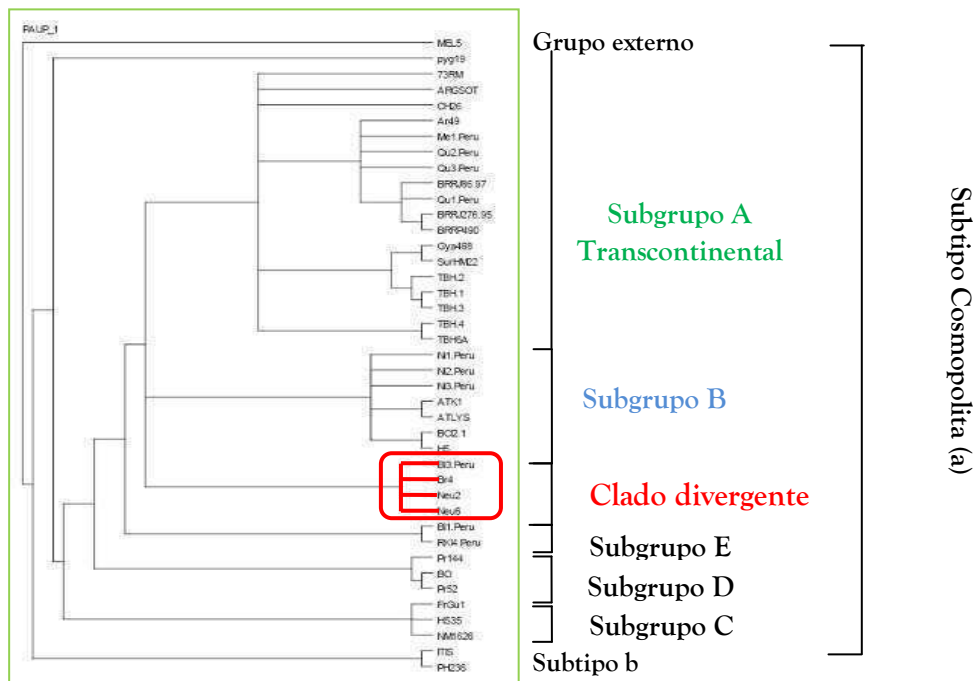
**Figura 18. Sección ampliada de la figura 16.** Se muestra al clado Sudafricano, en el cual se incluyeron las secuencias provenientes de los individuos infectados de la familia 1 (BD18\*, FL1 y FL2) y por fuera del mismo los integrantes de la familia 2 (ATL3 y FL3). \*BD18 resultó negativo para la amplificación del LTR. A la derecha se esquematiza el parentesco de las secuencias incluidas en el análisis.

En relación a las dos secuencias (Neu2 y Neu6) pertenecientes a la familia 3, se confirmaron los resultados obtenidos anteriormente (figuras 14 y 15) con las inclusiones de esas secuencias pertenecientes a dos hermanas peruanas con HAM/TSP, en un *cluster* monofilético por fuera del subgrupo Transcontinental y de todos los subgrupos conocidos. Un análisis más profundo de dicho clado se detalla en la siguiente sección.

## 2.4. CLADO DIVERGENTE: DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO SUBGRUPO

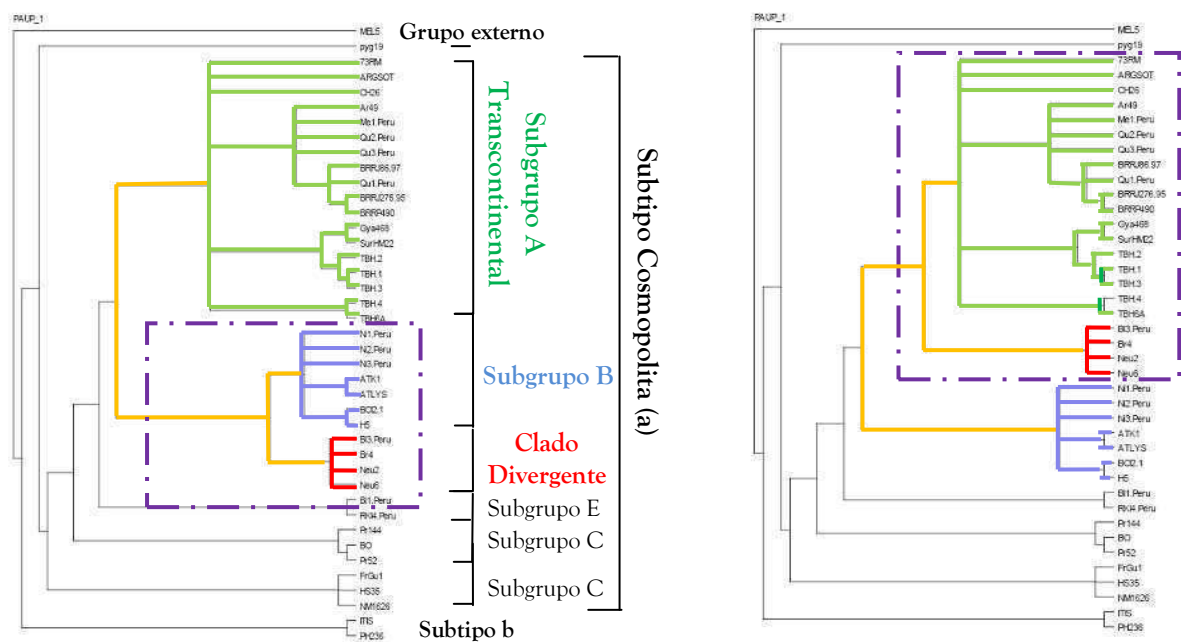
### 2.4.1. Origen filogenético del clado divergente

El análisis filogenético descrito en el punto 2.1 (figura 14) mostró que el **clado divergente** se ubicó más cercanamente relacionado a los subgrupos A y B, respecto del resto de los subgrupos descritos dentro del subtipo Cosmopolita del HTLV-1. Sin embargo, el mismo no permitió resolver las relaciones de ancestralidad entre ellos.



**Figura 19. Análisis del clado divergente.** Árbol de ML ultra paramétrico obtenido para la región LTR en donde se observa la presencia de las secuencias Neu2 y Neu6 agrupadas monofiléticamente dentro de un **clado divergente** respecto al resto de los subgrupos (rectángulo rojo).

Con el objetivo de dilucidar dicha relaciones, se comparó estadísticamente las topologías obtenidas bajo la restricción impuesta de que las secuencias divergentes (Neu2 y Neu6 junto con las referencias B13 y Br4) agruparan monofiléticamente con referencias pertenecientes a los subgrupos A o B. En ambos casos se encontró un árbol óptimo en el cual las cuatro secuencias divergentes agruparon en un clado monofilético ubicado por fuera del subgrupo A o B, respectivamente (Figuras 20 a, b). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre ambas topologías y entre éstas y el árbol original (Figura 19), obteniendo los valores  $p=0,238$  y  $p=0,519$  para las topologías de las figuras 20.a y b, respectivamente (test de Shimodaira-Hassegahua).



**Figura 20.** Árboles filogenéticos de la región LTR obtenidos por ML. a) incluyó a las referencias de los subtipos a-d y a los cinco subgrupos A-E descritos, construido bajo el supuesto “las secuencias divergentes pertenecen al subgrupo A”. b) *idem* pero construido bajo el supuesto “las secuencias divergentes pertenecen al subgrupo B”.

#### 2.4.2. Análisis de Similitud

El valor del índice de similitud (IS) fue menor para los integrantes de un mismo subgrupo (intra-subgrupo), respecto a los obtenidos por comparación entre los integrantes de distintos subgrupos (inter-subgrupos). Se obtuvo un valor medio del IS intra-subgrupo de  $0,014 \pm 0,004$  (IC 95% 0,010-0,019), mientras que el valor medio de IS inter-subgrupo fue de  $11,77 \pm 1,91$  (IC 95% 6,68-16,65), evidenciando una diferencia de casi tres logaritmos entre ambos parámetros. En relación al **Clado divergente**, se obtuvieron valores de IS intra (0.013) e inter-subgrupo (11,7) del mismo orden de magnitud que el obtenido para el resto de los subgrupos ya descritos del subtipo Cosmopolita (a) (Tabla 9). Considerando estas evidencias se denominó al grupo divergente “**Subgrupo F**”, siguiendo la nomenclatura empleada en la bibliografía.

Tabla 9. Análisis de Similitud de la secuencia del LTR del HTLV-1.

Subgrupos	A	B	C	D	E	F
IS Intra- Subgrupo	0.015	0.013	0.021	0.010	0	0.013
IS Inter-Subgrupo	11.502	9.486	14.147	11.523	7.774	11.679

### 3. ORIGEN ÉTNICO Y HTLV-1: PREDOMINIO DE HAPLOGRUPOS AMERINDIOS

Se incluyeron un total de 82 muestras, considerando 9 provenientes de pobladores originarios (*Kollas*) y 73 de individuos residentes de Buenos Aires. Se excluyeron del análisis las muestras BD20 y Neu2 (residentes de Buenos Aires) y Jujuy78 (individuo originario) por estar emparentadas matrilinealmente con otras incluidas en el estudio y una muestra de un individuo originario (Jujuy49) que resultó  $\beta$ -actina negativa.

#### 3.1. Residentes de Buenos Aires

De un total de 73 muestras, se amplificó la región control del ADNmt en 60 de ellas. El análisis de las mutaciones diagnósticas evidenció la presencia de 73,2% de haplogrupos autóctonos de origen Americano (10% A2, 25%B2, 21,6%C1 y 16,6% D1), y el resto (26,6%) de origen alóctono los cuales incluyeron 20% de origen Euroasiático Occidental, 5% Africano y 1,8% Asiático Oriental (Figura 21).

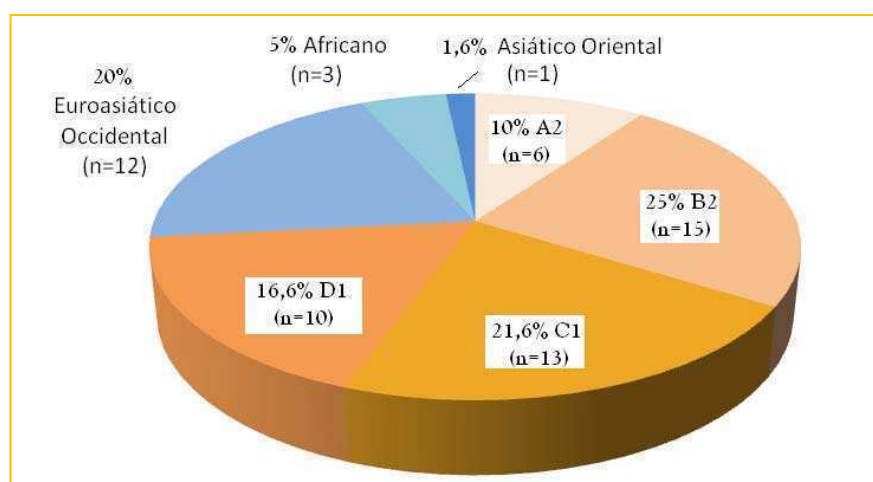


Figura 21. Frecuencia de haplogrupos autóctonos (naranjas) y alóctonos (celestes) detectados en residentes de Buenos Aires.

**Tabla 10. Haplogrupos alóctonos detectados en residentes de Buenos Aires HTLV-1 positivos**

Origen	Haplogrupo
Euroasiático Occidental	H, T1a, K1a11, U1a1, N1b
Africano	L1c, L1b, L0a2
Asiático Oriental	M7a

Considerando el análisis filogenético del LTR, en el clado Sudafricano, las secuencias de residentes de Buenos Aires incluidas pertenecieron a individuos con haplogrupo amerindio B2 (FL1, FSW1, BD21) y uno con haplogrupo Euroasiático H (BD1). El clado Latinoamericano Menor, que incluyó secuencias provenientes de nativos africanos, incluyó individuos con haplogrupos amerindios: A2 (BD32), C1 (FSW4) y D1 (FSW5, ATL1). Sin embargo, dentro del clado Latinoamericano Mayor, el cual filogenéticamente agrupó secuencias LTR provenientes de amerindios incluyó a las secuencias detectadas en los tres individuos residentes de Buenos Aires con haplogrupo de origen africano: L10 (BD4), L1b (FL4) y L0a2 (BD28), una de ellas (BD4) cercanamente emparentada con las secuencias de Jujuy, incluida en el subcluster 1 (figura 16).

### 3.2. Individuos originarios

De un total de 9 muestras incluidas, se amplificó la región control del ADNmt en 7 de ellas. El análisis de las mutaciones diagnósticas evidenció la presencia haplogrupos amerindios: A2 (14,3%), B2 (57,1%), D1 (14,3%) y D4h3a (14,3%), no habiéndose detectado haplogrupos alóctonos.

## VARIABILIDAD VIRAL

### 3. Presencia de mutaciones en el genoma proviral

#### 4.1. Región promotora viral: secuencia LTR

Se analizó el número de mutaciones puntuales para cada secuencia empleada en el análisis filogenético, las cuales se determinaron por comparación con la secuencia prototipo ATK-1. Al comparar las 73 secuencias de residentes de Buenos Aires se detectaron 76 mutaciones. Considerando las secuencias divergentes Neu2 y Neu6 (subgrupo F), se evidenció la presencia de 4 cambios exclusivos en ellas. Por otro lado, mediante el mismo análisis para las secuencias provenientes de Jujuy se detectaron 14 cambios nucleotídicos en total (Tabla 11).

En este estudio además se incluyeron muestras que pertenecieron a individuos relacionados. En los casos de hermanos (secuencias Neu2 y Neu6; Jujuy78 y Jujuy79) y en el caso de la madre e hijo (FL1 y FL2) pertenecientes a la Familia 1 se evidenció un 100% de identidad nucleotídica. Mientras que las secuencias LTR de los esposos incluidos en la familia 2 (ATL3 y BD29) difirieron en 1 nucleótido entre ellas (ATL3, A8661G).

Tabla 11. Mutaciones presentes en las secuencias LTR de residentes de Buenos Aires e individuos originarios (N=83).

Frecuencia (n)	Cambio nucleotídico respecto a la secuencia prototipo ATK-1
Residentes de Buenos Aires (n=73)	
100% (73)	A8367C*, InsA8429, G8446A*, A8509G*, A8510G
98,6% (72)	G8231A
93,2% (68)	G8616A
91,2% (67)	C8606G
34,2% (25)	A8403G
16,4% (12)	T8313C, delT8574
12,3% (9)	A8477G
11% (8)	G8391A
6,8% (5)	T8488C, G8545A, C8665T
5,5% (4)	G8295A, C8420T, C8606A
4% (3)	A8325G, G8441A
2,7% (2)	T8226C, A8237C, G8314A, delG8336, A8340G, G8393A, A8402G, delC8422, A8451G, A8473G
1,4% (1)	T8226C*, G8231T, G8248C, A8250T, G8295T, G8308A, G8314A*, C8320G, G8351A, A8340G*, A8358G, C8364G, C8366G, A8402G*, delC8421, delG8423, T8433C, A8435G, G8463A, A8475G, A8478T, C8489G, A8565G, T8586C, G8596A, G8603A, T8605A, C8613T, A8631G, C8658A, T8666C, C8668T, T8670A, C8672A, G8674T, C8675T, C8686T, A8701T
Comunidad Originaria (n=10)	
100% (10)	A8367C*, A8403G, InsA8429*, G8446A*, A8509G*, T8546C, C8606G, C8616A, delA8510
80% (8)	T8488C
40% (4)	C8489G
10% (1)	G8653A, G8393A, G8391A

\*Cambios respecto a ATK-1 presentes en todas las muestras ya sea de Buenos Aires o Jujuy.

\*En rojo se indican los cambios respecto a ATK-1 sólo detectados en las secuencias divergentes.





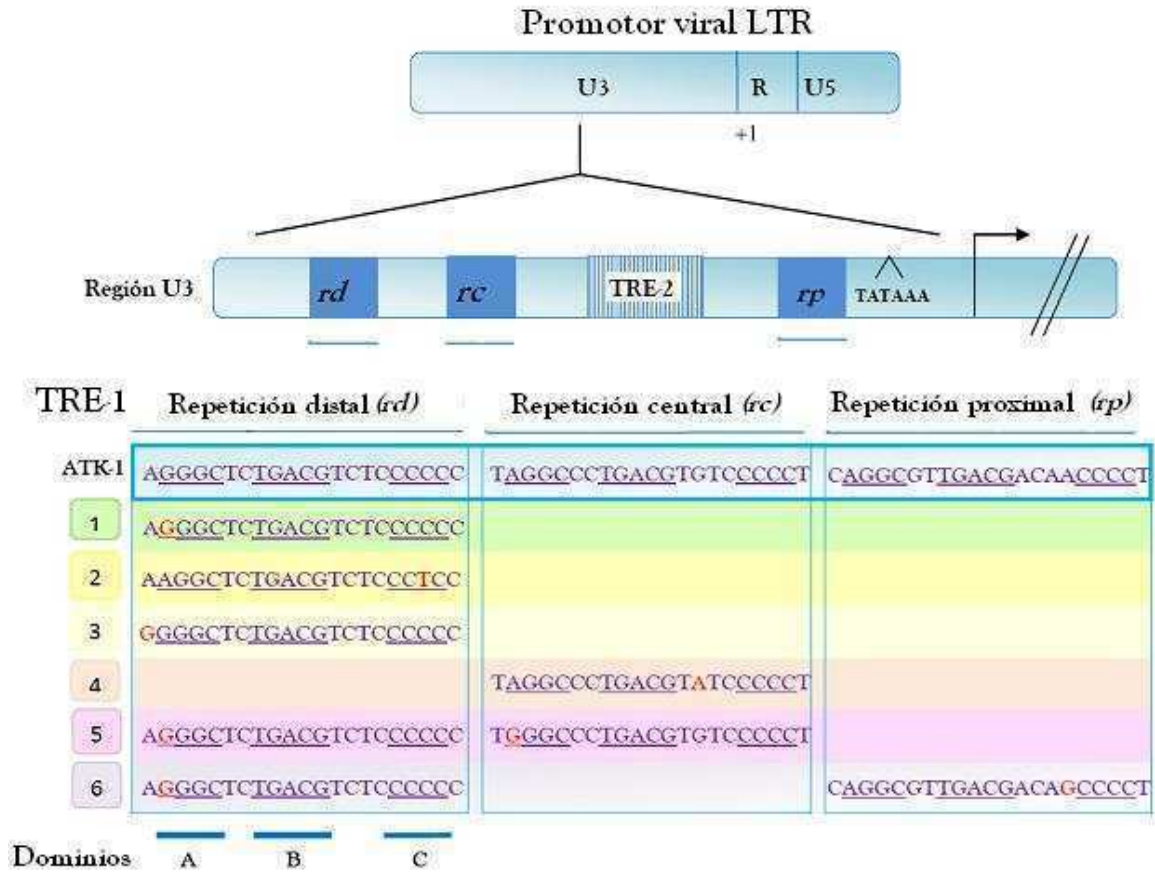
#### 4.1.1. Elemento de respuesta a Tax tipo 1: TRE-1

El análisis de las 83 secuencias LTR (73 de residentes de Buenos Aires y 10 de individuos originarios) evidenció la presencia de 6 patrones distintos de mutación en el TRE-1, tratándose en todos los casos de mutaciones puntuales (transiciones) respecto a la secuencia prototipo ATK-1. Cuatro de ellos, fueron mutaciones ubicadas en solo una de las tres repeticiones (3 en la repetición distal y 1 en la repetición proximal) y 2 secuencias provenientes de residentes de Buenos Aires presentaron mutaciones en dos repeticiones simultáneamente (distal/central y distal/proximal), designando las seis mutaciones con números del 1 al 6.

La mayor variabilidad se observó en las muestras provenientes de individuos residentes de Buenos Aires, donde se detectaron las seis variantes, mientras que el análisis de las secuencias LTR de individuos de Jujuy, sólo evidenció la presencia de la variante número 1, la cual se detectó en todas las secuencias estudiadas de Jujuy (Tabla 11, Figura 23).

Considerando los dominios altamente conservados incluidos dentro de cada repetición, denominados A, B y C, se detectaron mutaciones en el dominio A de las repeticiones distal y central (variantes 1, 5 y 6), en el dominio C de la repetición distal (variante 2) y por fuera de estos dominios en el nucleótido 1 de la repetición distal (variante 3), en el 14 (variante 4) de la repetición central y en el nucleótido 16 (variante 6) de la repetición proximal. Ésta última, ubicada en una zona rica en nucleótidos C/G, sitio reconocido por ser al cual Tax se une

directamente al ADN. No se detectaron mutaciones en el dominio B de las repeticiones, conocido por ser el sitio de unión de factores de la familia ATF/CREB. (Figura 23).



**Figura 23. Mutaciones presentes en el TRE-1 de la región LTR.** Se muestra el esquema del promotor viral LTR y de las regiones U3, R y U5. En los cuadros de colores se muestran las variantes detectadas (1-6) detectadas en las 83 secuencias LTR analizadas. ATK-1 es la secuencia prototipo utilizada como referencia en el análisis. Los nucleótidos subrayados ilustran los dominios A, B y C ubicados dentro de cada repetición.

#### 4.1.2. Elemento de respuesta a Tax tipo 2: TRE-2

Se realizó el mismo análisis pero con la secuencia TRE-2 del LTR. Se observó que todas las muestras analizadas difirieron respecto de la secuencia prototipo ATK-1, detectándose 5 variantes distintas, 3 de ellas en las secuencias LTR provenientes de residentes de Buenos Aires y 2 en individuos originarios. En el primer caso se trató de dos transiciones A/G (variante 7); una transición A/G y una deleción de la posición 23 del TRE-2 (variante 8); y una doble deleción de las posiciones 22 y 23 (variante 9). En el segundo caso, se detectó una deleción de la posición 10 y 22 y transición A/G en la posición 23 (variante 10), y cuatro secuencias que además de estas mutaciones, presentaron una transversión C/G en el nucleótido 1 (variante 11) (Figura 24).

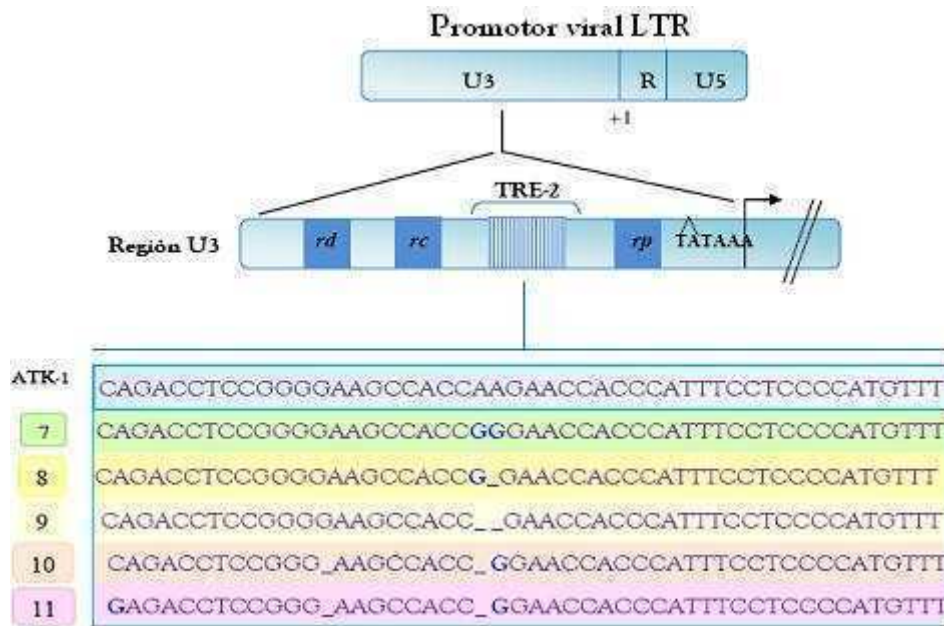


Figura 24. Mutaciones presentes en el TRE-2 de la región LTR. Se muestra el esquema del promotor viral LTR y de las regiones U3, R y U5. En los cuadros de colores se muestran las variantes detectadas (7-11) en las 83 secuencias estudiadas.

A continuación se muestra una tabla con las secuencias que presentaron mutaciones simultáneas en los dominios TRE-1 y TRE-2.

**Tabla 12. Mutaciones en los motivos TRE-1 y TRE-2 en la misma secuencia LTR y estado clínico de los individuos partir de los cuales se obtuvieron las secuencias.**

Residentes de Buenos Aires (n=73)					
Variante TRE-1	Variante TRE-2	Subgrupo	N	Estado clínico	
1	8	A	25	Asintomáticos/19 HAM/TSP/5 ATL/1	
2	8	A	4	Asintomático	
4	8	A	1	Asintomático	
5	8	A	1	Asintomático	
6	8	A	1	HAM/TSP	
3*	7	F	2	HAM/TSP	
Comunidad originaria (n=10)					
1	10	A	4	Asintomático	
1	11	A	6	posible neuropatía (n=1) Asintomático (n=5)	

\*Secuencias divergentes

## 4.2. Región codificante de la proteína transactivadora Tax: análisis de mutaciones no sinónimas en dominios funcionales.

### 4.2.1. Residentes de Buenos Aires

Del total de 75 muestras incluidas, se amplificaron 67 por n-PCR. El análisis de la secuencia nucleotídica evidenció la presencia de mutaciones puntuales en todas las secuencias, obteniendo una variación promedio de  $6,2 \pm 1,5$  en los portadores asintomáticos y de  $6,9 \pm 2$  cambios nucleotídicos en los individuos que presentaron HAM/TSP y ATL ( $p > 0,05$ ). No se detectaron polimorfismos específicos asociados a la presencia de las patologías asociadas. El análisis *in silico* evidenció la presencia de los cambios C7897T en el 97% de las secuencias, C7959T en el 90% y los cambios G8208A y A8344C en todas las secuencias, los cuales están descriptos asociados a un patrón de restricción particular por RFLP denominado Tax A.

Se evaluó la presencia de mutaciones no sinónimas en sus dominios funcionales. Así, se halló una mutación en el aminoácido 39 (Arginina por Histidina, R39H) en el dominio de localización nuclear (NLS), presente únicamente en las secuencias Neu2 y Neu6 divergentes.

Hacia la zona central de Tax se detectaron mutaciones en un motivo LZR (del inglés *Leucine Zipper región*) correspondiendo a los cambios G118R, S132F, P136H, I191K, A221V, P224A. Considerando el solapamiento observado en los dominios funcionales de Tax, 5 de ellas (a excepción de G118R) se ubicaron en los dominios de dimerización y de activación con el factor celular NF- $\kappa$ B y a su vez, la mutación I191K se ubicó en la secuencia correspondiente a la señal de exportación nuclear (NES).

Estas mutaciones se detectaron de manera similar en secuencias provenientes de pacientes asintomáticos y HAM/TSP y ATL ( $p > 0,05$ ). No se detectaron mutaciones aminoacídicas entre los aminoácidos 225-232.

Hacia el extremo C-terminal, se detectaron 5 mutaciones (F302I, F304N, D330N, H331Y y E332K), las últimas 3 ubicadas en el motivo de secreción y presentes tanto en portadores asintomáticos y como en pacientes con HAM/TSP, incluyéndose a las 5 en el dominio de activación, conocido por unirse a varios factores como Rb, P-TEFb y P/CAF entre otros (Figura 25).

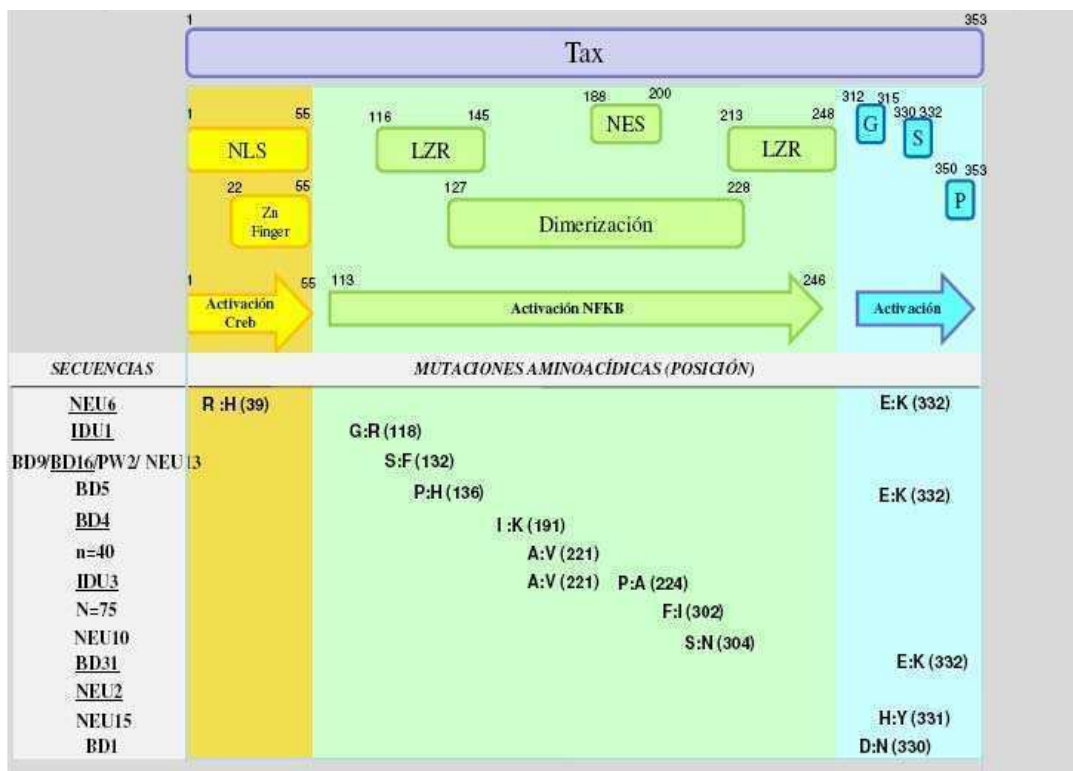


Figura 25. Mutaciones aminoacídicas en la proteína viral Tax. Se detallan los dominios funcionales de la proteína viral, las mutaciones con sus respectivas posiciones aminoacídicas y las secuencias que presentaron dichas mutaciones.

#### 4.2.2. Individuos originarios de Jujuy.

El análisis de la secuencia nucleotídica evidenció la presencia de mutaciones puntuales en todas las secuencias, obteniendo una variación promedio de  $5,2 \pm 0,5$  cambios nucleotídicos, valor similar al detectado en residentes de Buenos Aires asintomáticos  $p > 0,05$ .

Además se hallaron dos polimorfismos (T7914C y C7982T) presentes en las todas las secuencias de Jujuy, y ausentes en las de residentes de Buenos Aires. En todas las secuencias se detectó el alelo Tax A.

En relación al impacto de estas mutaciones en la secuencia de la proteína Tax, se hallaron sólo dos cambios de aminoácidos presentes en las 10 secuencias de Jujuy: A221V y F304N. El primero de ellos situado en la región central de la proteína en los dominios de dimerización y de activación del factor celular NF-kB, y la segunda en el extremo C-terminal, en una región a la cual no se le ha asignado alguna función por el momento, ambas mutaciones también detectadas en secuencias de Tax provenientes de residentes de Buenos Aires.





Esta tesis doctoral comprende por un lado, estudios epidemiológicos de la infección por HTLV-1 y su relación étnico-geográfica en poblaciones de Argentina y por otro, estudios de filogenia y de variabilidad viral. Además, se estudió la presencia de otras infecciones como la de HTLV-2, HIV-1 y *Treponema pallidum*.

Es así, que inicialmente se estimó la prevalencia y las características epidemiológicas de la infección por HTLV-1 en comunidades originarias que incluyeron a *Kollas* de Jujuy (familia lingüística Aymará); Sagua-Huarpes de San Juan (familia lingüística Huarpe); Wichis de Formosa y Chaco (familia lingüística Matacomataguayo) y Mbyá-Guaraníes de Misiones (familia lingüística Tupí-Guaraní).

Como era esperado se detectó la presencia de infección por HTLV-1 en la comunidad *Kolla* de la Puna Jujeña hallándose una cifra de prevalencia (9.8%) similar a la reportada en 1999, para nativos de la misma región (51). Sin embargo, si bien no hubo una diferencia significativa entre ambos estudios la prevalencia actual obtenida fue 3.8 veces mayor, sugiriendo este dato un posible incremento de la tasa de infección en esta comunidad a lo largo del tiempo. Estudios realizados en Sudamérica en el mismo año, han descripto seroprevalencias que van de 0.8% a 6.8% en individuos originarios pertenecientes también a la familia lingüística Aymará, que habitan el territorio andino de Perú, Bolivia y Chile confirmando estos datos un área geográfica de infección natural endémica para este retrovirus (13). En la mayoría de estas poblaciones la infección ha sido descripta con mayor prevalencia en el sexo femenino (27). En este estudio, se incluyeron un total de 93 mujeres y 19 hombres con diferencia significativa en la composición de la población según el género, sin

embargo se observó una prevalencia similar para la infección por HTLV-1 en mujeres (7%) y hombres (3%), respectivamente ( $p>0.05$ ).

En cuanto a las enfermedades, aunque se han descripto focos de HAM/TSP y ATL en nativos *Kollas* de la provincia de Jujuy (52, 53), esta vez, no se evidenció ningún caso en la población estudiada. Este hecho podría deberse a que el estudio fue de corte transversal y haya incluido individuos asintomáticos con posibilidades de desarrollar posteriormente una de las dos patologías, ya que ambas presentan períodos de latencia muy prolongado con un mínimo de 20 años. Ahora bien, si consideramos que la mediana de la edad de los individuos estudiados fue de 51 años y que el N poblacional incluido fue significativo, podríamos sustentar que el tipo de estudio no constituyó una limitación para dicha detección. Por el contrario, sí lo es, el hecho que la ATL es una leucemia de progresión rápidamente letal dentro de los seis meses al año, siendo frecuente su sub-diagnóstico, más aún en este tipo de poblaciones aisladas o de bajo nivel socio-económico. Es por ello, que el único reporte sobre casos de ATL en Jujuy, es un estudio retrospectivo a partir de biopsias (53). Por otro lado, el método de reclutamiento sí pudo haber limitado a individuos con síntomas en miembros inferiores asociados a la HAM/TSP para acudir al lugar de obtención de la muestra.

De todos modos, hubo un caso de una mujer HTLV-1 positiva de 49 años de edad con neuropatía en miembros inferiores que reportó como antecedente familiar alteración en la marcha de su padre, con alta sospecha de padecer HAM/TSP.

En relación a los antecedentes de riesgo de los individuos HTLV-1 positivos, los datos epidemiológicos sugieren que la adquisición de la infección fue muy probablemente por vía vertical, dado que todos fueron amamantados y que no reportaron uso de drogas inyectables ni antecedentes previos de transfusión. En relación a este hecho, observamos que la mayoría de los casos fueron mujeres que ya tenían un hijo o más, a los cuales también amamantaron. De todos modos, la vía de transmisión horizontal no puede ser descartada, dado que esta población se caracteriza principalmente por ser endogámica, hecho que sustenta aún más la circulación del virus en esta comunidad. Es relevante destacar que del total de individuos *Kollas* estudiados la mayoría (94%) reportó desconocer la existencia de la infección, aún viviendo en un área descrita ya desde hace años como endémica (51).

En cuanto a la presencia de otras infecciones de transmisión sexual, se ha detectado infección confirmada por *T. pallidum* en ésta y el resto de las comunidades estudiadas, observándose cifras de prevalencia significativamente diferentes entre los Wichis de Chaco (0,6%) y el resto de las comunidades (8,4% en Mbyá-Guaraní, 10% en *Kollas*, 1,3% en Huarpes y 7,9% en Wichis de Formosa). Este resultado difiere de los obtenidos en dos estudios previos realizados en la década del 90 en comunidades originarias de Argentina. Uno de ellos, incluyendo los grupos étnicos *Kolla*, *Wichi* y *Mapuche*, donde no se detectó infección por *T. pallidum* (108) y el otro realizado en Wichis y Tobas de la Región Chaqueña con un solo caso detectado (109). Esto datos indicarían un cambio en la dinámica de esta infección en estos grupos en los últimos años. En relación al HTLV-2, se detectó un caso en la comunidad *Wichi* del Chaco

con una prevalencia de 0,6%; resultado predecible ya que la región Chaqueña es endémica para este retrovirus reportándose prevalencias que varían de 4% a 30% según la comunidad y área estudiada (109). Estos resultados de infección por HTLV-1 y 2 corroboran la existencia de un clúster étnico-geográfico de infección naturalmente endémica para ambos retrovirus; que no fueron evidenciados en originarios de San Juan y Misiones (13, 51). Considerando la infección por HIV-1, similar a estudios previos, no se detectó en ninguna de las comunidades estudiadas; muy probablemente debido a que aún permanecen culturalmente aisladas y en su mayoría sin haber adquirido conductas y/o factores de riesgo para esta infección.

De todos modos, en cuanto a las características de estas comunidades, la comunidad Mbyá-Guaraní se encuentra a tan sólo 5 km de Puerto Iguazú. Esta cercanía a una ciudad importante junto con las necesidades económicas que padecen sus integrantes, propiciaron la exposición de los miembros de esta comunidad a conductas de riesgo, como el uso de drogas. Esta situación se reflejó con el caso de un nativo que reportó ser usuario de drogas inyectables.

Por el contrario, si bien la comunidad *Kolla* de Jujuy se erige en una de las zonas turísticas por excelencia como es la Quebrada de Humahuaca, ellos conservan muy arraigadamente sus costumbres, conviviendo con el turismo al cual le ofrecen sus productos (ritos, comidas, vestimentas, etc) y persisten menos influenciados por las costumbres urbanas, manteniendo y defendiendo su patrimonio cultural. Por otro lado, si bien las condiciones de las comunidades Wichis de Laguna Yema (Formosa) y “Wichi” (El impenetrable, Chaco), también son de extrema pobreza, su ubicación

geográfica hace muy difícil el acceso a la misma, y por consiguiente la influencia de la ciudad sobre la comunidad se ve restringida. Finalmente, la comunidad Sagua-Huarpe, si bien se encuentra próxima a la capital sanjuanina mimetizándose con costumbres urbanas como la vestimenta y el lenguaje, sigue conservando su propia organización social, incluyendo la presencia de caciques, con un mínimo contacto con la ciudad, acudiendo a la misma en determinadas ocasiones.

En conclusión, en base a todas estas observaciones, se desprende la necesidad de implementar estrategias de prevención y educación adaptadas a cada una de estas comunidades según sus pautas socio-culturales.

Para realizar la caracterización filogenética se analizaron las muestras HTLV-1 detectadas en la comunidad *Kolla* y en individuos residentes en Buenos Aires cuyas muestras se obtuvieron en el último caso, en estudios previos (58-61). El análisis evidenció la presencia del subtipo Cosmopolita (a) /subgrupo Transcontinental (A) en ambas poblaciones, corroborando datos que lo describían como mayoritario en Sudamérica incluyendo el Noroeste argentino (62). Dentro de este subgrupo, todas las secuencias de Jujuy y 20 de Buenos Aires agruparon junto con referencias de amerindios de Argentina, Brasil y Perú en el Clado Latinoamericano Mayor demostrando una circulación de cepas virales regionales, las cuales muy probablemente se hayan introducido en la población general de Buenos Aires a partir del contacto con individuos provenientes de áreas endémicas, sea del Noroeste argentino u otros países sudamericanos. Con respecto a las secuencias de los *Kollas*, la mayoría se ubicó monofiléticamente en un clado que llamamos subcluster 1 y que

además incluyó 4 secuencias (BD27, BD4, BD23 y Neu12) provenientes de residentes de Buenos Aires sin antecedentes de haber nacido o residido en un área endémica; dato que confirmaría la introducción de variantes virales del Noroeste argentino en esta ciudad. A excepción, dos secuencias de Jujuy (Jujuy37 y Jujuy47) se ubicaron más distantes del resto de las de Jujuy, pero próximas a secuencias de individuos de Buenos Aires nacidos en áreas endémicas como Bolivia, Perú y el Norte argentino.

Dentro de este clado Latinoamericano se observaron también 3 secuencias provenientes de individuos HIV-1 positivos con antecedente de ser UDIs (IDU1, IDU2, IDU3), y similar a lo que ocurrió con el HTLV-2, se estaría evidenciando una introducción de la infección entre usuarios de drogas a partir de grupos originarios con infección natural por HTLV-1 (110). En oposición, un grupo de secuencias también provenientes de individuos HIV-1 con diferentes conductas de riesgo (PW2, MSM4, IDU4, Neu3, BD2, Neu5), agruparon juntas por fuera del Clado Latinoamericano Mayor, evidenciando un origen común del retrovirus.

Es así, que tenemos que tener en cuenta que en algunos grupos en riesgo, la infección podría expandirse más rápidamente que en poblaciones con infección natural impactando con el tiempo en la epidemiología de la infección en la ciudad de Buenos Aires. Estos datos plantean la necesidad de monitorear la infección en grupos específicos para evitar una mayor diseminación de la misma.

En oposición, 23 de las secuencias provenientes de residentes de Buenos Aires se ubicaron dispersas sin agrupar en un clado particular, dentro del subgrupo Transcontinental (A) con referencias de mestizos y caucásicos de Brasil y Perú. Una

de las secuencias perteneció a una mujer con ATL que acudió a nuestro centro para diagnóstico y luego fue estudiado su esposo, a quien se le detectó HTLV-1, ambos nacidos en el área endémica de Salta. Era de esperar que estas secuencias virales agrupen en el clado Latinoamericano junto a otras provenientes de amerindios.

Por otro lado, se detectaron solo 4 secuencias cercanamente emparentadas con referencias provenientes de descendientes africanos de Guyana y Surinam que se incluyeron en el previamente descrito clado Latinoamericano Menor, sugiriendo un origen común entre ellos y la circulación de secuencias provenientes de países africanos. Este dato se corrobora con la detección de otras 6 secuencias pertenecientes a cinco individuos sin antecedentes de riesgo (BD1, BD21 y BD8) y a tres individuos con antecedentes de riesgo, los cuales incluyeron a una mujer trabajadora sexual (FSW1) nacida en Perú, a una mujer Peruana y a su hijo (quien fue amamantado) (FL1 y FL2), que agruparon con referencias de Sudáfrica, Guyana y Surinam en un clado diferente al Latinoamericano Mayor y Menor, denominado Sudafricano, confirmando la introducción de cepas de origen africano.

Otros subgrupos han sido reportados en menor número en Sudamérica, detectándose en Perú y Brasil al subgrupo Japonés B en comunidades de origen japonés o el *Black Peruvian* E en individuos Peruanos de origen negro (18, 20). Sin embargo, a pesar de que en este estudio se han incluido individuos provenientes de Perú y un individuo descendiente de japoneses, no se ha detectado ninguno de los subgrupos mencionados circulando en estas poblaciones, a diferencia de un estudio



realizado en nuestro país que describe la presencia del subgrupo Japonés B en un individuo de Córdoba y en dos descendientes de nativos de Jujuy (62).

Para finalizar, fue interesante el hecho de detectar 2 secuencias provenientes de mujeres de origen peruano residentes en Buenos Aires (Neu2 y Neu6) que agruparon en un clado divergente junto con dos referencias de Perú y Brasil, previamente clasificadas como subgrupo B pero sin soporte estadístico significativo y que se ubicaban separadas respecto de todos los subgrupos descriptos. En este estudio, el análisis filogenético y de similitud de secuencia aportaron evidencias para clasificar a dichas secuencias en un nuevo subgrupo que se denominó F, resultado confirmado además por cuatro métodos de inferencia filogenética distintos (ML, P, NJ y B). Estos resultados fueron concluyentes permitiendo una nueva actualización en cuanto a la caracterización de la epidemiología molecular de la infección por HTLV-1.

Considerando los antecedentes de riesgo, el análisis epidemiológico de los mismos mostró que en el grupo de Buenos Aires se presentaron todas las conductas de riesgo asociadas a la vía de transmisión del retrovirus, incluyendo la vía parenteral, a diferencia de lo detectado en la comunidad *Kolla* de Jujuy, en donde se evidenció transmisión vertical y horizontal. Estos datos concuerdan con estudios epidemiológicos previamente realizados en distintas poblaciones de riesgo de Buenos Aires en los que se han detectado prevalencias de infección por HTLV-1 cercanas al 5% en UDIs (57). Esta situación debería ser considerada en el contexto de una ciudad que posee un alto índice de UDIs, en donde si bien la infección no ha sido

considerada endémica por el momento, coexisten factores que podrían influir en un cambio en la epidemiología de infección en el tiempo. Más aún, si se tiene en cuenta que la vía parenteral está asociada como uno de los factores implicados en el desarrollo de HAM/TSP, deberíamos plantear la necesidad de implementar medidas de Salud Pública que permitan brindar un monitoreo y asesoramiento adecuado a los individuos HTLV-1 positivos.

Además, si bien Buenos Aires presenta cifras muy bajas de prevalencias para la infección por HTLV-1 (111), esta ciudad ha sido elegida en los últimos años para residir por individuos provenientes de áreas endémicas (como Perú, Brasil, Chile, Bolivia, Japón e inclusive países de África) y es visitada por un gran número de turistas de todo el mundo. Esta situación crea un escenario en el cual la introducción de nuevas variantes retrovirales es posible. Vemos entonces, como los resultados moleculares confirman lo evidenciado por las características socioculturales, con un mayor grado de diversidad molecular de las secuencias HTLV-1 de muestras de Buenos Aires ubicadas a lo largo de todo el árbol filogenético en comparación con las secuencias evolutivamente más cercanas entre sí provenientes de originarios *Kollas* de Jujuy, coincidente con una población aun aislada o con menor apertura a conductas y hábitos de la comunidad urbana.

En relación al origen, las migraciones humanas y la introducción de los primeros pobladores en el continente americano, la baja variabilidad genómica del HTLV-1 y su modo de transmisión vertical le permitieron ser utilizado como un marcador antropológico de poblaciones infectadas mediante estudios de filogenia, demostrando la relación entre genotipos y su procedencia geográfica (33). Es así que se postula que migraciones independientes ocurridas en una etapa pre y pos-colombina contribuyeron a la introducción y diseminación de la infección en nuestro continente, la cual actualmente se detecta en los 13 países de Sudamérica con focos endémicos en poblaciones amerindias y en aquellas que poseen un importante componente genético africano (12, 20). En este estudio se confirmó la restricción étnico/geográfica de la infección natural, la cual sustenta la hipótesis de introducción pre-colombina de la infección. Por otro lado, el hallazgo de secuencias de residentes de Buenos Aires cercanamente emparentadas con referencias sudafricanas, provenientes de amerindios descendientes de africanos y el hallazgo de una secuencia proveniente de un individuo descendiente de japoneses, aportan resultados concluyentes que sustentan la introducción pos-colombina de la infección.

También, se realizó en este trabajo el análisis del ADN mitocondrial, que con su herencia estrictamente materna y baja variabilidad, permite detectar la presencia de mutaciones diagnósticas que lo clasifican en haplogrupos asociados a grupos étnicos definidos. Este permite estudiar el componente étnico de las poblaciones humanas y trazar rutas migratorias considerando la ancestralidad de las mismas.

Así, al analizar el ADNm de los individuos HTLV-1 positivos, se evidenció la presencia de un componente autóctono predominante, detectándose haplogrupos panamericanos (A2, B2, C1, D4h3a) de origen asiático en todos los *Kollas* y en el 73% de los residentes de Buenos Aires. En el 27% restante se identificaron haplogrupos alóctonos con 20% de origen Euroasiático Occidental (H, J, T, U, N1b), 5% de origen Africano (L0 y L1) y un 2% de origen Asiático Oriental (M7a). Este hecho, concuerda con los datos disponibles según el INDEC (1947-2001) (112), donde se observa que el aporte europeo disminuye marcadamente desde mediados del siglo XX y es reemplazado por la migración interna, de los países limítrofes y de Perú, de elevada composición amerindia, los cuales además presentan focos endémicos de infección por HTLV-1 (12).

Al evaluar los resultados filogenéticos en relación al haplogrupo se observó que algunas secuencias que agruparon en el clado Latinoamericano Mayor con referencias de amerindios provenían de individuos con haplogrupos Euroasiáticos y Africanos. Las cepas clasificadas filogenéticamente como de origen africano pertenecieron a individuos con haplogrupo B2 amerindio, mientras que una secuencia de Buenos Aires que agrupó junto a las de Jujuy provenía de un donante

con haplogrupo de origen africano. Estos datos sugieren el contacto entre estas poblaciones y sustenta la hipótesis de introducción de la infección con la llegada de esclavos africanos en la época pos-colombina. Este resultado concuerda con los reportados en otros países de Sudamérica, como Perú y Guyana Francesa. En este último caso, se ha demostrado la adquisición de la infección por HTLV-1 en amerindios de ese país a través del contacto con Creoles, grupo étnico descendiente de europeos y africanos (16, 20).

Con respecto a las secuencias divergentes Neu2 y Neu6 clasificadas en el nuevo subgrupo F, pertenecientes a mujeres de origen peruano, presentaron un haplogrupo panamericano B2, siendo evidente una ancestralidad de origen amerindia por la vía materna, congruente con el foco de endemia natural para HTLV-1 en ese país. Es llamativo el hallazgo de otro subgrupo en individuos peruanos, en quienes también se describió el último subgrupo conocido como Negro Peruano denominado E, que provenía de individuos peruanos con haplogrupo africano. Estos datos demuestran la importancia de las corrientes migratorias humanas en la diseminación de la infección y en la dinámica de introducción de nuevas variantes en un área geográfica determinada (11, 20).

Es así, que se postula que migraciones independientes ocurridas en una etapa pre y pos-colombina contribuyeron a la introducción y diseminación de la infección en nuestro continente, la cual actualmente se detecta en los 13 países de Sudamérica con focos endémicos en poblaciones amerindias y en aquellas que poseen un importante componente genético africano. En este estudio se confirmó la restricción

étnico/geográfica de la infección natural, la cual sustenta la hipótesis de introducción pre-colombina de la infección. Y los estudios filogenéticos arriba mencionados, permitieron el hallazgo de secuencias de residentes de Buenos Aires cercanamente emparentadas con referencias sudafricanas que aportan resultados concluyentes en relación a la introducción pos-colombina de la infección.

Para concluir, estos resultados muestran que debemos considerar ambas herramientas útiles y complementarias para comprender la importancia de las corrientes migratorias humanas en la diseminación de la infección y en la dinámica de introducción de nuevas variantes en un área geográfica determinada.

Como último objetivo de esta tesis, se procedió al análisis de variabilidad en relación a la patogénesis de la infección, presente en cepas virales detectadas en dos áreas geográficas de nuestro país. Como hemos descripto, el HTLV-1 presenta una baja capacidad de mutar, mucho menor que la reportada para el HIV-1, característica principalmente debida a su mecanismo de expansión clonal, el cual le permite replicar el genoma prescindiendo del uso de la enzima viral TR.

Por otro lado, en la replicación y transcripción viral es clave el sistema LTR/Tax. La región promotora LTR responde a la transactivación mediada por la proteína Tax, la cual interactúa de manera directa uniéndose al ADN o indirectamente uniéndose a factores de transcripción celulares, en elementos regulatorios de respuesta a Tax denominados colectivamente TRE-1 y TRE-2 (80).

Así, en este trabajo se analizó el grado de variabilidad presente en la región LTR y Tax de cepas provenientes de un área endémica de infección natural (Jujuy) y de una zona no endémica (Buenos Aires).

La variabilidad de la región LTR fue estimada como el número promedio de mutaciones presentes en 500pb, obteniéndose un valor similar en ambas regiones geográficas para individuos asintomáticos pero significativamente mayor entre éstos y los casos de HAM/TSP y ATL. A su vez, el estudio de las secuencias TREs evidenció la presencia de un único patrón de mutación en todas las secuencias obtenidas de individuos originarios de Jujuy, en contraposición a los seis patrones que se observaron en las secuencias de Buenos Aires, entre los cuales se incluyó al detectado en Jujuy.

En relación a Tax, el análisis de la secuencia codificante de la proteína evidenció la presencia de 2 mutaciones puntuales (T7914C y C7982T), presentes en las 10 secuencias de Jujuy, las cuales representan marcas distintivas (del inglés “*molecular signatures*”) de las secuencias del noroeste estudiadas, dado que no se observaron en las secuencias de Buenos Aires.

El análisis de esta secuencia también involucró el estudio de dos polimorfismos asociados a la presencia de HAM/TSP, hecho reportado en Japón. El primero se trató de una mutación puntual en la posición 7959 del genoma retroviral (con cambio de Alanina por Valina) y el segundo, de un patrón de restricción denominado alelo Tax A, detectado con mayor incidencia entre pacientes neurológicos (94, 96). Sin embargo, estudios posteriores sugirieron que ambos

polimorfismos estarían asociados al genotipo molecular Cosmopolita/Transcontinental (aA) y no a la presencia de patología (97, 107). En el presente estudio, el análisis de la secuencia Tax reveló la presencia del alelo Tax A en todas las secuencias de Jujuy pero no en todas las de Buenos Aires como es el caso de la perteneciente a un paciente con ATL (ATL2) y a 4 portadores asintomáticos (BD5, IDU4, BD19 y BD31). De todos modos, todas las secuencias fueron clasificadas en el mismo subgrupo Transcontinental sustentando la relación entre la presencia de mutaciones específicas y el área geográfica de procedencia de la infección, independientemente del estado clínico.

Estos datos en conjunto reflejan, por un lado, la existencia de un área endémica de infección por HTLV-1 en el noroeste de nuestro país, con micro circulación geográfica de cepas altamente emparentadas entre sí y una mayor variabilidad en Buenos Aires, no asociada a las características virales de replicación, sino a la introducción de cepas que difieren entre sí. Así, el pool génico viral existente en esta área no endémica sería la consecuencia de las oleadas migratorias de personas infectadas provenientes de distintas áreas endémicas para la infección.



En relación al componente viral asociado a la patogénesis de la infección, numerosos estudios se han enfocado en la caracterización de una cepa de HTLV-1 neuropatogénica o leucemogénica, sin resultados concluyentes al presente, siendo una limitación importante la cantidad de pacientes con HAM/TSP o ATL incluidos.

Sin embargo, son numerosos los estudios en los que se evalúa *in vitro* la importancia del sistema LTR/Tax en relación al impacto que tendrían mutaciones en elementos claves de la replicación viral en el desarrollo de las patologías asociadas.

Así, el estudio *in vitro* de secuencias generadas por mutagénesis dirigida de la región LTR, permitieron caracterizar la importancia de los TREs en la activación de la transcripción basal del HTLV-1. Se ha concluido que dentro de cada TRE, el dominio B es el que se encuentra más conservado, requiriéndose la presencia de los dominios A y B ó B y C para que el TRE en cuestión sea funcional (81). Estos resultados fueron corroborados por este trabajo, que no detectó mutaciones en el dominio B del TRE-1 de ninguno de los 83 genotipos estudiados, pero sí en los dominios A y C.

Si consideramos que estos últimos dominios son los implicados en la interacción con factores de transcripción celular claves en la activación del LTR, podríamos pensar que estas mutaciones tengan posibles implicancias funcionales.

En este trabajo, las mutaciones detectadas fueron transiciones, sugiriendo quizás cierta presión de selección en esta zona de interacción proteína-DNA. Además, el hecho de que sólo se halla detectado un patrón de mutación que involucra a la repetición proximal, avala la hipótesis de la funcionalidad no equivalente de los

TREs, siendo éste el más conservado como ha sido descrito (80, 81, 113). Además, esta diferencia funcional atribuida a los TREs se ve reflejada en la unión diferencial de distintos factores de transcripción, por lo que dependiendo del sitio de las mutaciones (sea en la repetición distal, central o proximal del TRE-1) afectaría distintas vías de señalización. Se ha descrito mediante ensayos *in vitro* de cambio de la movilidad electroforética (EMSA), que en los dominios A y C del promotor proximal existen sitios de unión a la familia de factores Sp1. Por otro lado, el dominio B posee sitios de unión a factores de transcripción de la familia ATF/CREB, habiéndose demostrado una unión competitiva de Sp1 y ATF/CREB por los dominios del TRE-1 (114). Entonces, mutaciones que disminuyan la afinidad de ATF/CREB, aumentarían la probabilidad de unión de factores de transcripción de la familia SP1 y viceversa.

En los patrones de mutación obtenidos en residentes de Buenos Aires, no se evidenciaron mutaciones en el dominio B ni C, mientras que sí se detectó un caso en particular de una mujer con HAM/TSP (Neu7), cuya secuencia LTR presentó un patrón de doble mutación que involucró el dominio A de la repetición distal y en una base adyacente al dominio C de la repetición proximal, con una posible implicancia de ésta última en la acción directa mediada por Tax.

En relación al elemento de respuesta a Tax tipo 2 (TRE-2), se dudaba si realmente podía influir en la transcripción del LTR por sí solo, dado que está constituido por una sola repetición. Estudios en los que se realizaron deleciones en la región del LTR, demostraron que la presencia de una sola de las secuencias

promotoras del TRE-1, en particular la del promotor proximal, sería suficiente para actuar en un nivel basal de transcripción (81, 114). Estos hallazgos sustentarían entonces que TRE-2 aunque sea una sola repetición pueda actuar independientemente de los TRE-1. Recientemente, se observó que tanto el HTLV-3 como el HTLV-4, carecen de la repetición distal del TRE-1, y ya es conocido que en el HTLV-1 la delección de la repetición central es más crítica que la distal en lo que a la transcripción basal respecta (113).

En nuestras secuencias se determinó la existencia de tres patrones de mutación en el TRE-2, en comparación con los siete observados en el TRE-1, sugiriendo ser un elemento más conservado.

En relación al análisis *in silicio* de la secuencia de la proteína Tax evidenció una menor variabilidad en las cepas provenientes del Noroeste, hecho evidenciado por la presencia de sólo dos mutaciones aminoacídicas que no afectaron algún dominio funcional conocido, en comparación con 12 cambios aminoacídicos en las secuencias de Buenos Aires tanto de individuos asintomáticos como con HAM/TSP y ATL. Estas se presentaron con distintas frecuencias, ubicándose 10 de ellas en dominios proteicos implicados en las funciones transactivadoras de la proteína Tax sobre el LTR, entre otros. Entonces, si bien no se ha detectado por el momento una asociación entre las mutaciones ya descritas y la HAM/TSP o ATL; la caracterización de variantes virales que presenten cambios que involucren elementos claves de la replicación viral deberían continuar en estudio, considerando estudios a futuro que incluyan un mayor número de muestras pertenecientes a pacientes con

ambas patologías, la edad en relación a la presentación de la enfermedad, y ensayos *in vitro* que evalúen el impacto de las mismas en el nivel de transcripción y expresión viral.



✚ En el presente trabajo de tesis se confirmó una alta prevalencia de la infección natural por HTLV-1 en la comunidad *Kolla* de Jujuy, dato que sustenta nuevamente la existencia de un área endémica en el Noroeste argentino con la restricción étnico/geográfica ya descrita en Sudamérica.

✚ La infección por HTLV-2 fue detectada en un individuo Wichí de Formosa mientras que no se observó en las otras comunidades estudiadas.

✚ Si bien, la infección por HIV-1 no fue detectada, se demostró la presencia de infección por *T. pallidum* en los cinco grupos originarios, hallándose dos casos de coinfección con HTLV-1 y sugiriendo que la vía sexual es una forma de diseminación de infecciones en estas poblaciones.

✚ El análisis filogenético determinó que las secuencias HTLV-1 estudiadas, tanto de Jujuy como de Buenos Aires, eran subtipo Cosmopolita perteneciendo la mayoría al subgrupo Transcontinental (aA).

✚ Se observó que 28 (34%) secuencias de Buenos Aires agruparon junto con las de Jujuy en el clado Latinoamericano Mayor con secuencias LTR de referencia provenientes de Amerindios ( $p=0.82$ ), demostrando su cercanía evolutiva.

✚ Dentro del clado Latinoamericano Mayor se observó un subcluster 1 que agrupó 8 secuencias *Kollas* con 4 de Buenos Aires que no presentaron antecedente de nacimiento o residencia en área endémica sugiriendo la introducción de la infección en un área no endémica a partir del Noroeste.

✚ Se observó un clado integrado por 3 secuencias de individuos coinfectados por HIV-1, todos usuarios de drogas inyectables, que agruparon dentro del clado Latinoamericano mayor con referencias de amerindios, sugiriendo la introducción del HTLV-1 proveniente de áreas del Noroeste o países limítrofes endémicos para la infección en este grupo de riesgo.

✚ Cuatro secuencias de Buenos Aires (3 nacidos en Buenos Aires y 1 en Salta) agruparon en el clado Latinoamericano Menor junto a referencias de origen africano, mientras que 5 secuencias de Buenos Aires se incluyeron en el clado sudafricano (3 de ellos nacidos en Perú y dos en Buenos Aires); datos que sugieren la introducción de cepas sudafricanas en esta ciudad.

✚ Se identificó un nuevo subgrupo del subtipo Cosmopolita denominado F a partir de muestras provenientes de residentes de Buenos Aires de origen peruano (Neu2 y Neu6) que agruparon monofiléticamente con referencias de Brasil y Perú sugiriendo la introducción de nuevas variantes retrovirales en nuestro país.

✚ Al estudiar el origen étnico de los *Kollas* HTLV-1 positivos, se evidenció la presencia de tres de los cuatro haplogrupos panamericanos (A2, B2, C1).

✚ En los individuos HTLV-1 positivos de Buenos Aires se evidenció la presencia de un componente autóctono predominante, detectándose 73% de haplogrupos amerindios (A2, B2, C1 y D1) y en menor frecuencia haplogrupos alóctonos con un

20% de origen Euroasiático Occidental (H, J, T, U, N1b), 5% de origen Africano (L0 y L1) y un 2% de origen Asiático Oriental (M7a). Estos resultados sugieren la influencia de las oleadas migratorias en la epidemiología de la infección y un aporte pos-colombino de secuencias retrovirales al pool génico viral preexistente en nuestro país.

✚ El promedio de mutaciones en la región LTR fue similar para las secuencias provenientes de portadores asintomáticos de Jujuy y de Buenos Aires. Sin embargo, este parámetro fue significativamente mayor cuando se comparó con las secuencias provenientes de individuos con HAM/TSP o ATL.

✚ Al analizar la región promotora viral LTR de 73 muestras HTLV-1 positivas de Buenos Aires, se detectaron seis variantes con uno o dos cambios nucleotídicos en el dominio A y/o C de la repetición proximal y/o distal del TRE-1 que podrían tener efecto sobre la transactivación viral mediada por Tax.

✚ Se observó una única mutación (G/A) en el nucleótido 2 del dominio A de la repetición distal de la región TRE-1 en todas las secuencias de Jujuy, evidenciando una mayor homogeneidad de la población viral.

✚ Las secuencias divergentes Neu2 y Neu6 presentaron la mutación (G/A) en el nucleótido 1 del dominio A de la repetición distal del TRE-1 detectadas también en la referencias del subgrupo F y no observada en ninguna de las otras secuencias.



✚ El análisis *in silico* de la secuencia codificante de la proteína Tax confirmó los datos del LTR, obteniéndose en las secuencias de Jujuy una menor variabilidad nucleotídica expresada en menores cambios aminoacídicos.

✚ No se evidenció asociación entre alguna mutación particular y la presencia de HAM/TSP o ATL.



1. Coffin JM. Retroviridae: The viruses and their replication. In Fields Virology. Third edition edited by B.N. Fields DM, Knipe PM, Howley, et al. Raven Publishers, Philadelphia. (1996); 2, Chapter 51: 1437-500.
2. Baltimore D. RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature. (1970); 226: 1209-11.
3. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (1980); 77: 7415-9.
4. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow. Science. (1976); 193: 1007-8.
5. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa, Takatsuki K and Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. Blood. (1977); 50: 481-92.
6. Kalyanaraman VS, Sarndadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science. (1982); 218: 571-3.
7. Mahieux R, Gessain A: The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. Pathol Biol (Paris) (2009);57:161-166.
8. Calattini Sara, Sébastien Alain Chevalier, Renan Duprez, Sylviane Bassot, Alain Froment, Renaud Mahieux and Antoine Gessain. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology. (2005); 9; 2:30.
9. Coffin JM., Essex M, Graf TM, et al. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses.(1995).1-586.

10. Koralnik IJ, Boeri E, Saxinger WC, Monico AL, Fullen J, Gessain A, Guo HG, Gallo RC, Markham P, Kalyanaraman V, et al. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol.* (1994); 68(4):2693-707.
11. Slattery PJ, Franchini G and Gessain A. Genomic Evolution, Patterns of Global Dissemination, and Interspecies Transmission of Human and Simian T-cell Leukemia/Lymphotropic Viruses. *Genome Res.* (1999); 9: 525-540.
12. Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, Galvão-Castro B, Alcantara LC, Remondegui C, Verdonck K, Proietti FA. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica.* (2006); 19(1):44-53.
13. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H, et al. Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses* (1999); 15:1235-1239.
14. Sonoda S, Li HC, Cartier L, Nunez L, Tajima K. Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* (2000); 16(16):1753-6.
15. Alcantara LC, de Oliveira T, Gordon M, Pybus O, Mascarenhas RE, Seixas MO, Gonçalves M, Hlela C, Cassol S, Galvão-Castro B. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. *AIDS.* (2006); 21;20:780-2.
16. Kazanji M, Gessain A. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. *Cad Saude Publica.* (2003); 19(5):1227-40.
17. Balcázar N, Sánchez G, Garcia-Vallejo F. Sequence and Phylogenetic Analysis of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 from Tumaco, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* (2003); 98(5): 641-648.
18. Vallinoto AC, Muto NA, Pontes GS, Machado LF, Azevedo VN, dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK, Ishak MO, Ishak R. Serological and molecular

evidence of HTLV-I infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. *Jpn J Infect Dis.* (2004); 57(4):156-9.

19. Ohtsu T, Tsugane S, Tobinai K, Shimoyama M, Nanri S, Watanabe S. Prevalence of antibodies to human T-cell leukemia/lymphoma virus type I and human immunodeficiency virus in Japanese immigrant colonies in Bolivia and Bolivian natives. *Jpn J Cancer Res.* (1987); 78(12):1347-53.
20. Van Dooren S, Gotuzzo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, Duwe S, Ellerbrok H, Grassmann R, Hagelberg E, Desmyter J, Vandamme AM. Evidence for a post-Columbian introduction of human Tcell lymphotropic virus type I in Latin America. *J Gen Virol* (1998); 79:2695–2708.
21. Van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat.* (2009); 30(2):E386-94.
22. Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One.* (2008); 12;3(3):e1764.
23. García A, Demarchi DA. Incidence and distribution of Native American mtDNA haplogroups in central Argentina. *Hum Biol.* (2009) ;81(1):59-69.
24. Avena S, Goicoechea A, Rey J, Dugoujon J, Bejean C, Carnese F. Mezcla génica en una muestra poblacional de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina.* (2006); 66: 113-118.
25. Bobillo M C, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Röck A, Bandelt H, Corach D, Parson W. Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med* (2010); 124:263–268.
26. Edlich RF, Hill LG, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. *J Long Term Eff Med Implants.* (2003); 13(2):127-40.

27. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. (2005); 24(39):6058-68.
28. Fujino T, Nagata Y. HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol*. (2000); 47(2):197-206.
29. Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, Newman B, Lee TH, Chafets DM, Murphy EL; HTLV Outcomes Study Investigators. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis*. (2005); 191(9):1490-7.
30. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. (1999); 353(9168):1951-8.
31. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2005); 102:7994-7999.
32. Gasmi M, Farouqi B, d'Incan M, Desgranges C. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four North African patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. (1994); 10:1313-1315.
33. Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi S, Ishida T, Washio K, Ueda S, Hashimoto K. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994); 91:1124-1127.
34. Vidal AU, Gessain A, Yoshida M, Tekaia F, Garin B, Guillemain B, Schulz T, Farid R, De Thé G. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *J Gen Virol*. (1994); 75:3655-3666.
35. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with spastic paraparesis. *Lancet*. (1985); 2: 407-10.

36. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. (1986); 1(8488):1031-2.
37. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa, Takatsuki K and Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. *Blood*. (1977); 50: 481-92.
38. Yamaguchi Y, Kumagai T, Asou N, Lee SY, Kiyokawa T, Yoshioka R, and Takatsuki K. Smoldering adult T-cell leukemia. HTLV-1 has also an etiologic role in the diseases other than ATL. [Japanese]. *Rinsho Ketsueki. Japanese Journal of Clinical Hematology* (1986). 27: 670-6.
39. Barmak K, Harhaj E, Grant C, et al. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*. (2003); 308:1-12.
40. Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol*. (2006); 5(12):1068-76.
41. Jacobson S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J Infect Dis*. (2002); 186 Suppl 2:S187-92.
42. Carod-Artal FJ, Mesquita HM, Ribeiro LDS. Neurological symptoms and disability in HTLV-1 associated myelopathy. *Neurologia* (2008); 23:78-84.
43. Olindo S, Cabre P, Lézin A, Merle H, Saint-Vil M, Signate A, et al. Natural history of human T lymphotropic virus 1-associated myelopathy: a 14-year follow-up study. *Arch Neurol*. (2006); 63:1560-1566.
44. Osame M. Diagnosis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. (1990); 79(3):261-5.
45. Mahieux R, Gessain A. Adult T-cell leukemia/lymphoma and HTLV-1. *Curr Hematol Malig Rep*. (2007); 2(4):257-64.
46. Duc Dodon M, Mesnard JM, Barbeau B. Adult T-cell leukemia induced by HTLV-1: before and after HBZ. *Med Sci (Paris)*. (2010); 26(4):391-6.

47. Romanelli LC, Caramelli P, Proietti AB. Human T cell lymphotropic virus type 1(HTLV): When should infection be suspected? *Rev Assoc Med Bras.* (2010); 56(3):340-7.
48. Tanosaki R, Tobinai K. Adult T-cell leukemia-lymphoma: current treatment strategies and novel immunological approaches. *Expert Rev Hematol.* (2010); 3(6):743-53.
49. Gastaldello R, Hall WW, Gallego S. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview. *J Acquir Immune Defic Syndr.* (2004); 35(3):301-8.
50. Biglione MM, Astarloa L, Salomón HE. High prevalence of HTLV-I and HTLV-II among blood donors in Argentina: a South American health concern. *AIDS Res Hum Retroviruses.* (2005); 21(1):1-4.
51. Dipierri JE, Tajima K, Cartier Robirosa L, Sonoda S. A seroepidemiological survey of HTLV-I/II carriers in the Puna Jujeña. *Medicina (B Aires).* (1999); 59(6):717-20.
52. Biglione MM, Pizarro M, Puca A, et al. A cluster of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Jujuy, Argentina. *J Acquir Immune Defic Syndr.* (2003); 32:441-445.
53. Marin O, Hasui K, Remondegui C, Sato E, Aye MM, Takenouchi N, Izumo S, Tajima K. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Jujuy, north-west Argentina. *Pathol Int.* (2002); 52(5-6):348-57.
54. Gonzalez LA, Villa AM, Kohler G, et al. Further studies on HTLV-I associated myelopathy in Argentina. *Medicina (B Aires)* (1998); 58:411-414.
55. Gioseffi ON, Nucifora E, Fantl D, et al. [Adult HTLV-I positive leukemialymphoma in Argentina]. *Sangre (Barc)* (1995); 40:421-424.
56. Biglione M. HTLV-I: enfermedades asociadas y seroprevalencia en la provincia de San Juan (Argentina) / *Hematología (B. Aires).* (2004); 8(3):67.
57. Berini CA, Pando MA, Bautista CT, Eirin ME, Martinez-Peralta L, Weissenbacher M, Avila MM, Biglione MM. HTLV-1/2 among high-risk



groups in Argentina: molecular diagnosis and prevalence of different sexual transmitted infections. *J Med Virol.* (2007); 79(12):1914-20

58. Weissenbacher M, Rossi D, Radulich G, Sosa-Estáni S, Vila M, Vivas E, Avila MM, Cuchi P, Rey J, Peralta LM. High seroprevalence of bloodborne viruses among street-recruited injection drug users from Buenos Aires, Argentina. *Clin Infect Dis.* (2003); 15;37: 5:S348-52.
59. Sosa-Estáni S, Rossi D, Weissenbacher M. Epidemiology of human immunodeficiency virus (HIV)/acquired immunodeficiency syndrome in injection drug users in Argentina: high seroprevalence of HIV infection. *Clin Infect Dis.* (2003); 15; 37: 5:S338-42.
60. Pando Mde L, Maulen S, Weissenbacher M, Marone R, Duranti R, Peralta LM, Salomón H, Russell K, Negrete M, Sosa Estani S, Montano S, Sanchez JL, Avila MM. High human immunodeficiency virus type 1 seroprevalence in men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: risk factors for infection. *Int J Epidemiol.* (2003); ;32(5):735-40.
61. Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections among female commercial sex workers in Argentina. Pando MA, Berini C, Bibini M, Fernández M, Reinaga E, Maulen S, Marone R, Biglione M, Montano SM, Bautista CT, Weissenbacher M, Sanchez JL, Avila MM. *Am J Trop Med Hyg.* (2006);74(2):233-8.
62. Gastaldello R, Iñiguez AM, Otsuki K, Lamas G, Balangero M, Barbas MG, Mangano A, Sen L, Maturano E, Remondegui C, Vicente AC, Gallego S. HTLV type 1 genetic types among native descendants in Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses.* (2008); 24(9):1139-46.
63. Gastaldello R, Otsuki K, Barbas MG, Vicente AC, Gallego S. Molecular evidence of HTLV-1 intrafamilial transmission in a non-endemic area in Argentina. *J Med Virol.* (2005); 76(3):386-90.
64. Yamashita M, Picchio G, Veronesi R, Ohkura S, Bare P, Hayami M. HTLV-Is in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-Is in Africa. *J Med Virol.* (1998); 55(2):152-60.

65. Grigsby IF, Zhang W, Johnson JL, Fogarty KH, Chen Y, Rawson JM, Crosby AJ, Mueller JD, Mansky LM. Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology*. (2010); 7:75.
66. Yasunaga J, Matsuoka M. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. *Rev Med Virol*. (2007); 17(5):301-11.
67. Rho HM, Poiesz B, Ruscetti FW, and Gallo RC. Characterization of the reverse transcriptase from a new retrovirus (HTLV) produced by a human cutaneous T-cell lymphoma cell line. *Virology* (1981); 112: 355-60.
68. Kobayashi Ohi Y, Asano T, Hayakawa T, Kato K, Kakinuma A, and Hatanaka M. Purification and characterization of human T-cell leukemia virus type I protease produced in *Escherichia coli*. *FRBS Letters*. (1991); 293: 106-10.
69. Manel Nicolas, Jean-Luc Battini, and Marc Sitbon. Human T Cell Leukemia Virus Envelope Binding and Virus Entry Are Mediated by Distinct Domains of the Glucose Transporter GLUT1. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. (2005); 29025–29029.
70. Journo C, Douceron E, Mahieux R. HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol*. (2009); 4(4):425-40.
71. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*. (2008); 14;5:76.
72. Bex F, Yin MJ, Burny A, Gaynor RB. Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol*. (1998); 18(4):2392-405.
73. Mick JE, Colgin MA, Brauweiler A, Nyborg JK. Analysis of CREB mutants in Tax complex formation and trans-activation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. (2000); 16(16):1597-601.

74. Jeong SJ, Lu H, Cho WK, Park HU, Pise-Masison C, Brady JN. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax. *J Virol.* (2006); 80(20):10036-44.
75. Kesic M, Doueiri R, Ward M, Semmes OJ, Green PL. Phosphorylation regulates human T-cell leukemia virus type 1 Rex function. *Retrovirology.* (2009); 17;6:105.
76. Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology.* (2009); 3;6:71.
77. Van Prooyen N, Andresen V, Gold H, Bialuk I, Pise-Masison C, Franchini G. Hijacking the T-cell communication network by the human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) p12 and p8 proteins. *Mol Aspects Med.* (2010); 31(5):333-43.
78. Baydoun HH, Bellon M, Nicot C. HTLV-1 Yin and Yang: Rex and p30 master regulators of viral mRNA trafficking. *AIDS Rev.* (2008); 10(4):195-204.
79. Bindhu M, Nair A, Lairmore MD. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci.* (2004); 9:2556-76.
80. Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol.* (2002); 190(2):133-59.
81. Yao Jing and Brian Wigdahl. Human t cell lymphotropic virus type 1 genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. *Frontiers in Bioscience.* (2000); 5, 138-168.
82. Datta S, Kothari NH, Fan H. In vivo genomic footprinting of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) long terminal repeat enhancer sequences in HTLV-1-infected human T-cell lines with different levels of Tax I activity. *J Virol.* (2000); 74(18):8277-85.

83. Liu, S., and J. K. Cowell. Cloning and characterization of the TATAless promoter from the human GFI1 proto-oncogene. *Ann. Hum. Genet.* (2000); 64:83–86.
84. Salcedo-Cifuentes M, Cabrera J, Cuesta-Astroz Y, Carrasca E, Eizuru Y, Domínguez MC, Sánchez A, García-Vallejo F. Clonal expansion and genomic characterization of the human T-cell lymphotropic virus type I during the integration process in adult T-cell leukemia/lymphoma]. *Biomedica.* (2009); 29(2):218-31.
85. Meekings KN, Leipzig J, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog.* (2008); 21;4.
86. Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, Fugo K, Yao K, Cushman SW, Ruscetti FW, Jacobson S. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol.* (2007); 81:1506-10.
87. Lambert, Sophie Manuella Bouttier, Roger Vassy, Michel Seigneuret, Cari Petrow-Sadowski, Sébastien Janvier, Nikolaus Heveker, Francis W. Ruscetti, Gérard Perret, Kathryn S. Jones, and Claudine Pique. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood.* (2009); 21; 113: 5176–5185.
88. Asquith B, Bangham CR. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? *Trends Immunol.* (2008); 29:4-11.
89. Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One.* (2008); 28;3:2251.
90. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med.* (2010); 16(1):83

91. Boxus M and Willems L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *British Journal of Cancer*. (2009); 1497-1501.
92. Daenke S, Nightingale S, Cruickshank JK, Bangham CR. 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*. (1990); 64: 1278-82.
93. Switzer WM, Salemi M, Qari SH, Jia H, Gray RR, Katzourakis A, Marriott SJ, Pryor KN, Wolfe ND, Burke DS, Folks TM, Heneine W. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. *Retrovirology*. (2009); 6:9
94. Renjifo B, Borrero I, Essex M. Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *J Virol*. (1995); 69(4):2611-6.
95. Furukawa Y, Kubota R, Tara M, Izumo S, Osame M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood*. (2001); 97(4):987-93
96. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. (2000); 182(5):1343-9.
97. Iñiguez AM, Gastaldello R, Otsuki K, Balangero M, Carvalho Costa F, Remondegui C, Paula Vicente AC, Gallego S. Correlation of HTLV-1 Tax genetic diversity with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis progression and HTLV-1a genotypes in an HTLV-1 endemic region in Argentina. *J Med Virol*. (2010); 82(8):1438-41.
98. Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. 1992. 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* 30:1605-1607.

99. Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of 'nested' PCR products. *J Virol Methods* (1992); 40:163-173.
100. Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* (1999); 41:95-98.
101. Meertens L, Rigoulet J, Maucière P, Van Beveren M, Chen GM, Diop O, Dubreuil G, Georges-Goubot MC, Berthier JL, Lewis J, Gessain A. Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: Close relationship of STL-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. *Virology* (2001);287:275-285.
102. Swofford DL: PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998.
103. Goloboff P, Farris J and Nixon K TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* . (2008); 24: 774-786.
104. Guindon S and Gascuel O: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* (2003); 52(5):696-704.
105. Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
106. Kloss-Brandsta A; Pacher D; Scho S; Weissensteiner H; Binna R; Specht G; Kronenberg F. HaploGrep: A Fast and Reliable Algorithm for Automatic Classification of Mitochondrial DNA Haplogroups. *Hum Mutat.* (2010); 31:1-8.
107. Mahieux R, de Thé G, Gessain A. The tax mutation at nucleotide 7959 of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is not associated with tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy but is linked to the cosmopolitan molecular genotype. *J Virol.* 1995;69(9):5925-7.
108. Bouzas MB, Zapiola I, Quiruelas S, Gorvein D, Panzita A, Rey J, Carnese FP, Corral R, Perez C, Zala. HTLV type I and HTLV type II infection

- among Indians and natives from Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*. (1994); 10(11):1567-71.
109. Ferrer JF, Del Pino N, Esteban E, Sherman MP, Dube S, Dube DK, Basombrio MA, Pimentel E, Segovia A, Quirulas S. High rate of infection with the human T-cell leukemia retrovirus type II in four Indian populations of Argentina. *Virology*. (1993); 197(2):576-84.
110. Biglione M, Avila MM, Biglione J, Weisburd G, Libonatti O, Gessain A. Molecular characterization of HTLV-II from an intravenous drug addict with AIDS in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. (1996); 28(3):139-42.
111. Berini CA, Gendler SA, Pascuccio S, Eirin ME, McFarland W, Page K, Carnevali L, Murphy E, Biglione MM. Decreasing trends in HTLV-1/2 but stable HIV-1 infection among replacement donors in Argentina. *J Med Virol*. (2010); 82(5):873-7.
112. INDEC: Instituto Nacional de Estadística y Censo. 4to y 8vo Censo Nacional de Población y Vivienda, años 1947 y 1991.
113. Switzer WM, Salemi M, Qari SH, Jia H, Gray RR, Katzourakis A, Marriott SJ, Pryor KN, Wolfe ND, Burke DS, Folks TM, Heneine W. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type Retrovirology. (2009); 2, 6:9.
114. Wessner R, Yao J, Wigdahl B. Sp family members preferentially interact with the promoter proximal repeat within the HTLV-I enhancer. *Leukemia* (1997); 11(Suppl 3):10: 13.