

# **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y GENÓMICA DEL PROCESO DE INTEGRACIÓN DE PROVIRUS DEL VIRUS LINFOTRÓPICO HUMANO (HTLV) TIPO I**

por

**Felipe García Vallejo\***

## **Resumen**

**García Vallejo, F.:** Caracterización molecular y genómica del proceso de integración de provirus del virus linfotrópico humano (HTLV) tipo I. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **30** (115): 155-170. 2006. ISSN 0370-3908.

Se estudió del proceso de integración del HTLV-I desde varios enfoques conceptuales y metodológicos incluyendo estudios filogenéticos de la integrasa, sus características estructurales y la genómica estructural de la integración de provirus en células linfocitarias de individuos seropositivos. Estructuralmente se observó que los residuos HHCC en la región N-terminal y DDE en el centro catalítico de la enzima, estaban conservados en las integrasas del HTLV-I/II, del VIH-1 y del ASV. El grado de expansión clonal de linfocitos infectados en individuos seropositivos con Paraparesia espástica tropical, leucemia de células T del adulto y portadores asintomáticos fue variable. El número de amplicones de IPCR fue significativamente mayor en pacientes PET/HAM ( $8.6 \pm 2.5$ ) que en portadores asintomáticos ( $5.0 \pm 1.7$ ) o en pacientes ATL ( $2.8 \pm 3.0$ ) ( $P < 0.004$ ). Las secuencias del genoma humano de 50 nucleótidos que flanquean el 3'LTR presentaron grados de homología variable con cDNA provenientes de varias líneas celulares tumorales y de tejidos normales. Un alineamiento de tales secuencias permitió localizar cromosómicamente los diferentes provirus dentro del genoma humano. Los sitios de integración del HTLV-I en los individuos infectados estuvieron distribuidos de una manera no aleatoria preferencialmente en secuencias ricas en GC. En los cromosomas 8, 9 y 16 se encontró una mayor cantidad de secuencias provirales. La hibridización sustractiva de fragmentos de DNA humano generados por AFLP permitió una de dactilarización del fenómeno de integración dentro del genoma humano infectado, metodología que además es susceptible de ser utilizada en otros contextos moleculares.

**Palabras clave:** Genómica estructural, integración proviral, HTLV-I, PET/HAM.

\* Profesor Titular. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Director Científico del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Director de Colciencias.

### Abstract

The process of HTLV-I integration was analyzed under different approaches. Those included the phylogenetic analyses of the integrase, their structural characteristics and the structural genomics of the proviruses in lymphocytic cells of infected patients. Structurally it was observed that the HHCC amino acid residues at the N terminus and DDE in the catalytic core were consensus in the integrases of HTLV-I, ASV and HIV-1 viruses. The level of clonal expansion in infected lymphocytes of healthy carriers, TSP/HAM and ATL patients was variable. The number of IPCR amplicons was significant higher in TSP/HAM patients ( $8.6 \pm 2.5$ ) than in healthy carriers ( $5.0 \pm 1.7$ ) or ATL patients ( $2.8 \pm 3.0$ ) ( $P < 0.004$ ). The human genome sequences of 50 bp that flank the 3'-LTR of HTLV-I provirus had variable level of homology with cDNA of tumor cell lines and normal tissues. Alignments of such sequences possibilited the chromosomal location several proviruses. In general the integration sites in HTLV-I seropositive individuals were non randomly distributed in G:C rich domains of human genome. In chromosomes 8, 9 and 16 were recorded more integrated sequences. The substrative hybridization of AFLP fragments permitted the fingerprinting of integration process in the human genome. This methodology would be used in other molecular systems.

**Key words:** Genomics, Proviruses, HTLV-1.

### Introducción

El virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I), fue el primer retrovirus humano descubierto (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982; Hinuma *et al.*, 1982). Junto con el virus de la leucemia de células T del simio (STLV) y el HTLV-II, se ha incluido recientemente en el grupo de los virus linfotrópicos de primates (PTLV). Aunque los miembros del grupo PTLV son virus oncogénicos y pertenecen a la subfamilia Oncovirinae, no contienen oncogenes derivados de secuencias celulares siendo su replicación regulada por los genes *rex* y *tax*. Lo que los define como oncovirus es el producto proteico del gen *tax* (p40), el cual es una oncoproteína (Seiki *et al.*, 1983).

El virión del HTLV-I, es partícula envuelta de 110-140 nm de diámetro, se ha clasificado por su morfología como retrovirus tipo C de mamíferos. La envoltura del mismo contiene espigas compuestas por las proteínas de envoltura gp21 y gp46 y en su nucleocápside se encuentran la transcriptasa reversa y la proteasa íntimamente asociadas con el RNA genómico del virus y encerradas en las proteínas de la nucleocápside p15, p24 y p19. El genoma viral es un dímero de RNA<sup>+</sup> al cual se le liga una molécula de RNA de transferencia (tRNA<sub>pro</sub>), que sirve como cebador en el proceso de síntesis de DNA dirigido por la transcriptasa reversa (Tangy, 1996).

El cDNA del provirus es de aproximadamente 9032 nucleótidos y en general su estructura es un típico arreglo de genes 5'-*gag-pol-env*-3'. En su orden, la región Gag codifica para las proteínas de la nucleocápside p15, p19 y p24. La región Pol codifica para las enzimas Proteasa (Pr), Integrasa (In) y Transcriptasa reversa (RT). La región

Env codifica para las glicoproteínas de envoltura viral gp46 y gp21. La región pX que se localiza en el extremo 3' codifica para varias proteínas, entre las cuales se incluyen las proteínas reguladoras Tax y Rex sintetizadas a partir de un mismo mRNA policistrónico mediante splicing alternativo (Tangy, 1996; Coffin, 1992). La proteína Tax, cuya masa molecular es de 42 kDa, es un transactivador de la transcripción de los genes virales y de algunos genes celulares; la proteína Rex de 27 kDa actúa como un regulador post-transcripcional. A los dos extremos del cDNA proviral existen dos repeticiones terminales largas (LTRs) que contienen tanto el promotor para la expresión de los diferentes mRNA virales como otros elementos reguladores.

La infección por el HTLV-I ha sido implicada en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades (Watanabe 1997; Uchiyama 1997) que se pueden agrupar en 3 diferentes categorías: Enfermedades que se han establecido como entidades clínicas causadas por HTLV-I, tales como leucemia de células T del adulto (Uchiyama *et al.*, 1977; Yoshima *et al.*, 1984), paraparesia espástica tropical/mielopatía asociada a HTLV-I (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986), y uveítis HTLV-I (Mochizuki *et al.*, 1992); las tres asociaciones tienen un fuerte soporte epidemiológico y características clínicas únicas que las distinguen de otras similares. Aquellas que están asociadas a la infección por HTLV-I pero que no se ha aceptado su papel causal, entre éstas se encuentran la dermatitis infecciosa (La Grenade *et al.*, 1990), síndrome de Sjögren (Terada *et al.*, 1994), artritis (Nishioka *et al.*, 1989) y miositis (Leon-Monzon *et al.*, 1994), estas enfermedades no poseen soporte epidemiológico ni características clíni-

cas únicas, y un grupo de enfermedades que crece en número, sobre las cuales se ha sugerido la posible asociación con la infección debido a la seropositividad de los pacientes para HTLV-I, tampoco tienen soporte epidemiológico ni características clínicas únicas. Entre ellas podemos enumerar la polimiositis, neumopatía (**Kimura et al.**, 1996), linfadenitis (**Ohshima et al.**, 1992) y linfoma de células T cutáneo (**Shimoyama**, 1991), entre otras.

El HTLV-I se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo (**Blattner et al.**, 1985; **Zaninovic**, 1981 (a); **Zaninovic et al.**, 1986 (b); **Slattery Francini & Gessain** 1999. Evolution patterns of global dissemination and interspecies transmission of human and simian T cell leukemia viruses. *Genome Res.* 9: 525-540), siendo endémico en diferentes regiones geográficas entre las que se incluyen Sudamérica, el sur del Japón, la región del Caribe, Melanesia, Australia y África occidental (**Blattner et al.**, 1985). La infección por HTLV-I también se presenta en regiones no tropicales del planeta incluyendo Norteamérica, Centroamérica y algunos países de Europa, especialmente en poblaciones de drogadictos intravenosos y donantes de sangre. Se calcula que en el mundo hay alrededor de 20 millones de personas infectadas (**Mueller**, 1991). En Latinoamérica con una población de 360 millones de habitantes, la cifra es de aproximadamente 7 millones, entre 1% y 2% como tasa de infección (**Coffin**, 1992). En Colombia, el municipio de Tumaco en el Sur del Pacífico, es una zona endémica para el HTLV-I caracterizada por una alta tasa de incremento anual de PET/HAM (**Trujillo et al.**, 1992; **García-Vallejo et al.**, 1982). El HTLV-I infecta entre el 0.2 y el 10% de la población mestiza, negra e indígena de esta región, mientras las tasas de seropositividad entre los donantes de los bancos de sangre de la costa pacífica oscilan entre 0.2 y 0.8% (**Ijichi et al.**, 1993; **Cortés & García**, 1996). En la costa atlántica colombiana se ha descubierto recientemente un foco endémico municipio de Moñitos del departamento de Córdoba (**Quintana et al.**, 2004). También se conocen casos aislados en las regiones del Caribe (**Chávez et al.**, 2004; **Dangond et al.**, 1995), el Urabá antioqueño y la población de indígenas Wayú en la Guajira (**Ijichi et al.**, 1993). Varios trabajos revelan la existencia de mutaciones geográficamente restringidas en Tumaco, que no se habían reportado previamente en el Caribe, África y Japón (**García-Vallejo et al.**, 1995; **Renjifo et al.**, 1995; **Renjifo et al.**, 1996; **García-Vallejo**, 1996; **García-Vallejo et al.**, 2000; **Domínguez et al.**, 2002; **García-Vallejo & Zaninovic**, 2002; **Balcázar et al.**, 2003).

La integración del cDNA retroviral en el genoma del hospedero constituye una etapa crucial de su ciclo de vida

puesto que está directamente implicada en la expresión eficiente de su progenie (**Goff**, 1990; **Goff**, 1992; **Katzman & Skalka**, 1999). Este proceso, ha sido estudiado en varios sistemas de retrovirus, que incluyen el virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), el virus de la necrosis esplénica (SNV), los virus del sarcoma y leucosis aviar (ASLV) y el de la inmunodeficiencia humana (HIV-I); a partir de estos estudios se ha podido proponer un mecanismo general del evento de integración (**Sandmeyer et al.**, 1990). La mayoría de las regiones del genoma humano parecen ser accesibles a la integración retroviral y la frecuencia de uso de los potenciales sitios varía de manera considerable. Las primeras evidencias sugirieron que el proceso de integración de retrovirus era un proceso aleatorio (**Sandmeyer et al.**, 1990); sin embargo, nuevas evidencias dan soporte a una hipótesis sobre la existencia de "sitios calientes" para el proceso de integración (**Leclercq et al.**, 2000; **Cabrera & García-Vallejo**, 2000)

Lo que se conoce sobre la estructura de la integrasa de los retrovirus proviene de los estudios realizados sobre el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I) cuya integrasa consta de tres dominios (**Andrake & Skalka**, 1996). El dominio N-terminal que comprende una extensión de aminoácidos del 1 al 49, presenta residuos conservados en la secuencia HH...CC que permiten la formación de una estructura de dedo de zinc, estructura que le confiere propiedades de unión al DNA. El dominio central catalítico, que se localiza de los aminoácidos 50 al 219 contiene las secuencias canónicas DD35E y el dominio C terminal (aminoácidos 220-300) presenta una región menos conservada con propiedades de unión al DNA de forma inespecífica. Hasta el momento no se ha descrito la estructura de la integrasa del HTLV-I.

## Materiales y métodos

### La muestra

Durante más de cinco años se recolectaron, en diferentes zonas del país, muestras de individuos seropositivos para el HTLV-I. Todos los individuos que hicieron parte del estudio fueron informados de los objetivos del mismo y consintieron donar muestras de sangre periférica. Todas las muestras fueron caracterizadas como infectadas por el HTLV-I mediante la prueba de ELISA siendo confirmados por western blot específico para HTLV-I y además de un PCR con oligonucleótidos específicos para la región LTR, y el gene Tax. Tanto las muestras de plasma como las de linfocitos de sangre periférica se almacenaron en condiciones apropiadas para conservar su óptima estabilidad biológica.

### Extracción del DNA de linfocitos de pacientes seropositivos para HTLV-I

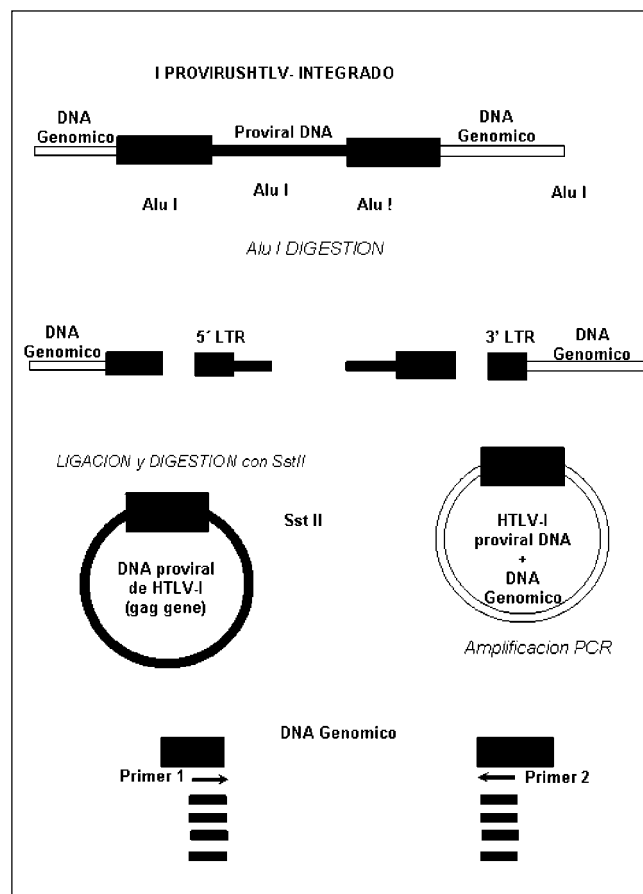
La obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de las cuales se obtuvo el DNA objeto de estudio, se realizó a partir de 5 ml de sangre total de todos los individuos naturalmente infectados mediante la técnica de Ficoll-Hypaque (Sambrook *et al.*, 1989). Una vez obtenidas las PBMC se lavaron dos veces con PBS y se sometieron a lisis con SDS/Proteinasa K a 56°C. El DNA fue extraído con fenol y precipitado con etanol al 100% y lavado dos veces en etanol al 70%. Al final de la extracción el DNA obtenido se resuspendió en 10mmol/L de Tris-HCl pH 8.0, 1mmol/L de EDTA que contenía 200 mg/ml de RNasa A. La concentración y el grado de pureza se determinaron mediante métodos espectrofotométricos. En todos los casos, se tomaron las precauciones necesarias para evitar la contaminación en el área donde se realizó la extracción del DNA.

### Amplificación del DNA de las regiones LTR y Tax

Para la obtención de los segmentos amplificados de las regiones LTR y del gen *tax* de los aislados que hicieron parte del presente trabajo se procedió según las condiciones descritas en trabajos previos (Balcázar *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2000). Brevemente, los cebadores utilizados para la primera ronda de amplificación de la región Tax fueron PXO1<sup>+</sup>, 5'-TCGAAACAGCCCTG CAGATA-3' (7257-7276) y PXO2<sup>-</sup>, 5'-TGAGC TTATA GATTTGTCTTCA-3' (8447-8467). Después de 35 ciclos de PCR se amplificó 1 ml de los productos de esta primera ronda utilizando los cebadores internos PXI1<sup>+</sup>, 5'-ATACAAAG TTAACCATGCTT-3' (7274-7293) y PXI3<sup>-</sup>, 5'-AGACG TC AGAGCCTTAGTCT-3' (8374-8393). Las condiciones de amplificación fueron las mismas en ambas rondas y consistieron en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, hibridación de los cebadores a 58°C durante 75 segundos y extensión a 72°C durante 90 segundos, con un periodo de extensión de final de ciclo de 10 minutos a 72°C. Para amplificar la región LTR se utilizaron los cebadores externos LTRO1<sup>+</sup>, 5'-ACCATGAGCCCCAAATATCCCC-3' (9-31) Y LTRO2<sup>-</sup>, 5'-TCGTATCCCGGACGAGCC CCAA-3' (757-746) en una primera ronda de PCR y en la segunda ronda se utilizaron los cebadores internos LTRI1<sup>+</sup>, 5'-AGACTAA GGCTCT GACGTCTCCC-3' (97-119) y LTRI2<sup>-</sup>, 5'-AATTTCTCTCC TGAGAGTGCT-3' (722-746). Las condiciones de amplificación fueron similares a las de amplificación de la región Tax.

### Amplificación del DNA genómico flanqueante al provirus HTLV-I por PCR inverso (IPCR)

Para llevar a cabo la amplificación enzimática mediante la técnica de PCR inverso (IPCR) se utilizó un protocolo desarrollado en Japón (Takemoto *et al.*, 1994), el cual fue adaptado para nuestras condiciones específicas. El proceso completo incluye 4 etapas a saber (figura 1): Una etapa inicial de digestión del DNA genómico infectado con la endonucleasa de restricción Alu I, que es una enzima de corte frecuente y reconoce una secuencia palindrómica de 4 pares de bases. El proceso continúa con una segunda etapa de autoligación de los fragmentos obtenidos en la etapa anterior mediante el uso de la enzima ligasa del DNA procedente del fago T4. En este punto se tuvo un especial cuidado de ajustar una concentración de DNA inferior a 50 ng/ml para evitar que se favorezca el proceso de ligación entre fragmentos diferentes y no la auto ligación que se buscaba. Una tercera etapa consistió en la



**Figura 1.** Estrategia general del proceso de IPCR utilizado para rescatar las secuencias de 50 bp del genoma celular que están adyacentes a los sitios de integración de los provirus HTLV-I.

digestión de los anillos dúplex formados en la etapa de auto ligación con una segunda endonucleasa de restricción, en este caso, la enzima SstII que reconoce específicamente un sitio de corte en la región U5 del LTR del genoma viral. Esta etapa es necesaria para eliminar los anillos de DNA que contengan DNA exclusivamente de origen viral, preservando así los que contengan el DNA genómico que es el que interesa en este estudio. Finalmente, en una cuarta etapa, 10 ng de los fragmentos auto ligados que no fueron digeridos por la segunda enzima de restricción fueron amplificados por PCR inverso en una primera vuelta de amplificación y por PCR directo anidado en una segunda vuelta de amplificación.

### Determinación del grado de expansión clonal

Cinco microlitros de los productos de PCR fueron empleados para resolver las bandas amplificadas o amplicones de acuerdo con su tamaño molecular mediante electroforesis en geles submarinos de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio de acuerdo con protocolos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). El grado de expansión clonal y el número de clones fueron calculados mediante el conteo de amplicones por muestra en las respectivas impresiones fotográficas, en donde un amplicón significa que se presentó la expansión de un solo clon –monoclonalidad– y varios amplicones evidencian que se ha presentado las expansiones simultáneas de varios clones o policlonalidad.

### Protocolos de clonación

Con el fin de secuenciar los amplicones de IPCR, los fragmentos amplificados fueron recuperados por elución a partir de geles de agarosa al 2% utilizando el estuche comercial QIAEX II Agarose Gel Extraction®. Brevemente, se extrae con la ayuda de un bisturí una porción lo más delgada posible de gel que contenga el amplicón de interés para ser disuelta por calentamiento en un buffer apropiado y para luego ser combinada con una resina que se liga reversiblemente al DNA. Después de dos etapas de centrifugación y lavado con el mismo buffer, el DNA se halla precipitado con la resina y la agarosa ha sido removida. El DNA finalmente es recuperado mediante elución en buffer TE pH 8.0.

Los fragmentos de DNA producto del IPCR eluidos fueron ligados al vector pCR2.1 y transformados en células DH5a haciendo uso del estuche comercial TA cloning System® de Invitrogen. En breve, se sometieron 10 ng del producto de PCR a una reacción de ligación asistida por la ligasa de DNA del fago T4 con 50 ng del vector pCR 2.1 durante 4 horas a 14°C. Los productos de ligación

fueron luego utilizados para la transformación de las células DH5a incubándolas durante 30 minutos sobre hielo con 2 ml de cada reacción de ligación. Al término de esta etapa se sometió la mezcla a choque térmico durante 2 minutos a 42°C, e inmediatamente se colocaron sobre hielo antes de ser incubadas con medio SOC durante una hora a 37°C con agitación. Posteriormente, se sembraron en placas de medio LB que contenía X-gal y ampicilina a una concentración de 50 mg/ml y se incubaron para crecer durante 18 horas a 37°C. Al final se colocaron a 4°C durante algunas horas hasta que los cultivos desarrollaron coloración azul. Acto seguido se seleccionaron las colonias transformantes blancas para ser cultivadas en medio LB líquido. Finalmente los plásmidos recombinantes fueron extraídos mediante un protocolo de lisis alcalina ampliamente utilizado (Sambrook *et al.*, 1989) y digeridos con Eco RI para verificar que tengan el inserto del fragmento de IPCR clonado.

### Secuenciación de DNA

Antes de su secuenciación los plásmidos recombinantes fueron cuantificados por espectrofotometría y purificados utilizando las columnas CENTRI-SEP® obtenidas de Princeton Separations Inc. La secuenciación de los plásmidos se realizó en un secuenciador automático ABI Prisma 370 utilizando el estuche comercial BigDye® terminator de APPLIED BIOSYSTEMS. Las mezclas finales que fueron llevadas al secuenciador para su resolución por electroforesis capilar, se obtuvieron mediante un tratamiento previo de los productos de PCR. Los productos de PCR se obtuvieron a partir de 200 ng de DNA después de 5 minutos de desnaturalización a 96°C, y 25 ciclos de amplificación consistentes en 15 segundos de desnaturalización a 96°C, 15 segundos de hibridación del cebador a 50°C y 4 minutos de extensión a 60°C. El tratamiento previo consistió en precipitar en DNA con etanol, acetato de sodio y etachinmato y una resuspensión final del DNA en un solvente cromatográfico adecuado.

### Alineamientos y asignaciones de secuencias

Todos los clones de IPCR fueron analizados utilizando el programa MEGABLAST del NCBI (USA) disponible en el sitio web: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Adicionalmente, se realizó un alineamiento para parejas de secuencias con el fin de buscar las homologías que presentaron los fragmentos de IPCR con secuencias existentes en el Genbank. Una búsqueda en la base de datos del NCBI que contiene la localización cromosómica de las secuencias del DNA humano permitió asignar la posición de los clones de IPCR secuenciados.

### Hibridación sustractiva de fragmentos de AFLP de DNA humano

Las muestras de DNA de los pacientes objeto de estudio fueron analizadas mediante AFLP siguiendo la metodología original descrita por Vos *et al.*, (1995). Se utilizaron muchas combinaciones de cebadores +3 incluidas en el estuche comercial que amplificaron selectivamente algunos fragmentos de DNA. Los productos de AFLP se resolvieron en geles desnaturizantes (Urea 7.5M) de poliacrilamida al 6% y se revelaron mediante una técnica estandarizada de tinción con plata.

Una vez establecidas las condiciones de un AFLP no variante, se desarrolló el método hibridación sustractiva empleando como sonda pMT2 se evaluaron en diferentes variables tales como: relación de DNA hibridado, tiempo de hibridación, condiciones de astringencia y condiciones de separación electroforética. Una vez se logró patronizar la metodología se aplicó a 10 individuos seropositivos para HTLV-I.

En este procedimiento, se permitió la hibridación en líquido antes de correr el gel de poliacrilamida no desnaturizante, de esta manera debido al mayor tamaño molecular de la sonda comparado con el de los fragmentos de AFLP, sólo entraron en el gel los fragmentos no hibridados. Por el contrario aquellos fragmentos que hibridaron con la sonda, o sea los que contenían la secuencia proviral, fueron retenidos y no entran en la región analizable del gel, así al correr paralelamente los AFLP de individuos sin la hibridación previa (-) y los AFLP de individuos a los que si se les realizó este proceso (+ o AFLP sustractivo), es posible determinar tanto el número de bandas AFLP que contienen secuencias provirales como su tamaño molecular.

### Métodos de modelación computacional

Para obtener una primera aproximación a una estructura tridimensional de la integrasa se utilizaron las secuencias de nucleótidos de la cepa ATK-1 del virus HTLV-I obtenida del Genbank (número de acceso J02029) y las secuencias de nucleótidos que codifican por IN de diversos retrovirus se obtuvieron de un trabajo publicado anteriormente (Muller *et al.*, 1999). Estas secuencias de nucleótidos se transcribieron, empleando el código genético nuclear, a otras de 300 aminoácidos que comienzan en prolina y terminan en el codón de parada del extremo 3' del gen pol. Para la alineación de las secuencias de la integrasa de varios retrovirus, se utilizó el programa CLUSTAL W versión 1.81.

### Predicción de la estructura secundaria y terciaria

Para la división de los dominios de la proteína, se aplicó el programa SMART ("*Simple Modular Architectural Research Tool*") (Schultz *et al.*, 2000; Letunic *et al.*, 2002). Este reconoce la secuencia de aminoácidos que se espera esté en la región intermedia entre dominios según lo que se conoce de otras proteínas ya estudiadas. Como método de predicción se utilizó el programa PREDICT PROTEIN (PP) de modelación por homología que se basa en la conservación de aminoácidos entre la proteína de interés y otras cuya estructura tridimensional ya es conocida. Para construir un perfil de hidropaticidad de la proteína integrasa se aplicó el algoritmo desarrollado por Kyte & Doolittle, 1982.

### Análisis estadístico de los resultados

Para establecer si hubo diferencias estadísticas en el número de amplicones IPCR entre los diferentes grupos y las diferencias estadísticas en la composición de bases que flanquean el sitio de integración de se utilizó la prueba t de student. la prueba de Chi cuadrado fue utilizada para determinar la significancia de cada uno de los cuatro nucleótidos en una determinada posición en la región de 50 un flanqueadora al 3'LTR de provirus HTLV-I.

### Resultados

#### Un modelo estructural de la Integrasa del HTLV-I

El alineamiento de las secuencias de diferentes retrovirus, mostró que la integrasa del HTLV-I tiene un tamaño de 300 aminoácidos que comienza con Prolina y termina en el codón de parada TAA en el extremo 3' del gen pol. Estructuralmente se identificaron los dominios que dividen la secuencia de los 300 residuos de aminoácidos. El dominio N-terminal que corresponde a los primeros 49 residuos de aminoácidos, el central o catalítico que incluye los residuos 50 al 212 y el C-terminal del aminoácido 213 hasta el 300.

Mediante la aplicación del algoritmo predictivo de Kyte-Doolittle, fue posible reconstruir un perfil de la hidropaticidad de la proteína. Éste definió el dominio central como altamente hidrofílico, coincidiendo varias regiones con el sitio activo, en contraste con el extremo amino en el que predominó la secuencia de aminoácidos hidrofóbicos.

La predicción del plegamiento secundario de la secuencia de los 300 aminoácidos de la integrasa del HTLV-I mostró que en el extremo N-terminal existen tres hélices  $\alpha$  ( $\alpha$  1, 7-13 a.a.;  $\alpha$  2, 16-23 a.a.;  $\alpha$  3, 29-42 a.a). En la

región central catalítica la predicción mostró 5 hojas  $\beta$  ( $\beta$ 1, 64-69 a.a.;  $\beta$ 2, 76-86 a.a.;  $\beta$ 3, 91-97 a.a.;  $\beta$ 4, 120-123 a.a.;  $\beta$ 5, 209-211 a.a.) y 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 4, 102-114 a.a.;  $\alpha$ 5, 131-147 a.a.;  $\alpha$ 6 158-176 a.a.;  $\alpha$ 7, 183-198 a.a.). En el extremo carboxilo de la integrasa del HTLV-I se asignaron 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 8, 248-254 a.a.;  $\alpha$ 9, 273-279 a.a.) y 3 hojas  $\beta$  ( $\beta$ 6, 231-236 a.a.;  $\beta$ 7, 258-262 a.a.;  $\beta$ 8, 269-271 a.a.).

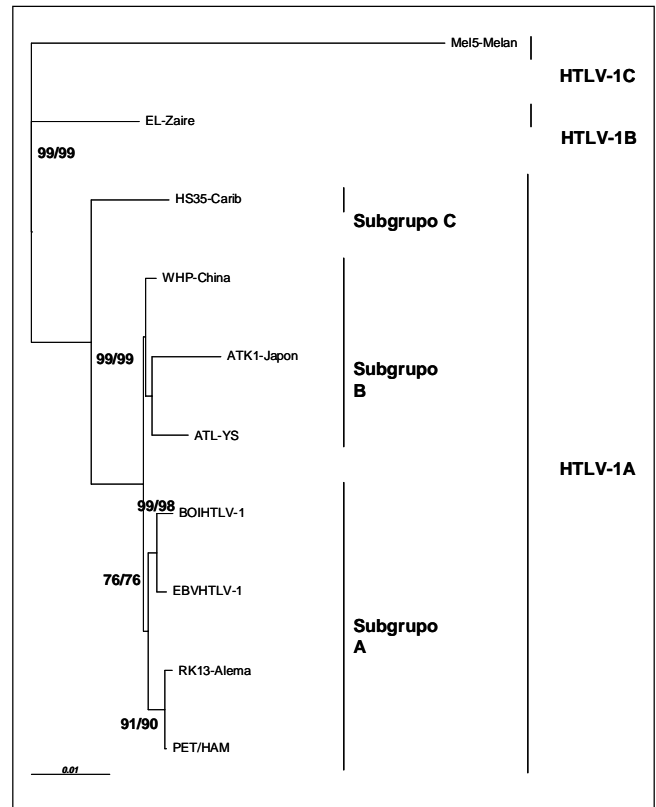
Mediante la aplicación de los métodos predictivos fue posible obtener una estructura terciaria con alto grado de confiabilidad, solamente la región central catalítica (49-221) (figura 2).

### Relaciones filogenéticas de la integrasa del HTLV-I

El análisis filogenético de las secuencias que codifican por la integrasa en los distintos subtipos de HTLV-I, mostró agrupaciones con topologías muy similares (figura 3). Se observó que el subtipo cosmopolita o HTLV-Ia está separado de los subtipos HTLV-Ib y HTLV-Ic presentando valores de “bootstrap” de 99% para NJ y para MP. En este subtipo se identificaron tres subgrupos: el subgrupo A o transcontinental, el subgrupo B o Japonés y el subgrupo C o del África Occidental / Caribe. La longitud de las ramas determinadas utilizando el método ML tuvo un valor de  $P < 0.01$ .



**Figura 2.** Predicción de la estructura tridimensional del dominio central catalítico de integrasa del HTLV-I. Se destacan los residuos del sitio activo Asp 21, Asp 78, y Glu 114.



**Figura 3.** Agrupamiento filogenético enraizado NJ/MP de 10 aislados empleados en el análisis filogenético del virus HTLV-I de diversos orígenes geográficos, con base en secuencias nucleotídicas que codifican la proteína integrasa. Se utilizó como “outgroup” la secuencia correspondiente a Mel-5 que es un aislado melanésico. Los números al pie de cada ramificación corresponden a los porcentajes calculados por NJ y MP respectivamente. (Bootstrap de 1000).

Al comparar los diferentes aislados de HTLV-I alrededor del mundo con la secuencia consenso del mismo, se determinó que la variación en términos de distancia genética utilizando el modelo de Kimura doble Parámetro para el dominio amino N-terminal fue de 0.007 a 0.051; para el central catalítico de 0.005 a 0.084 y para el carboxilo C-terminal de 0 a 0.056. Las distancias genéticas en el dominio carboxilo fueron las más bajas. Este resultado demostró que la secuencia de nucleótidos que codifica para los diferentes dominios de la integrasa en este virus presenta, en general, una alta homología tanto a nivel de nucleótidos como de secuencias de aminoácidos.

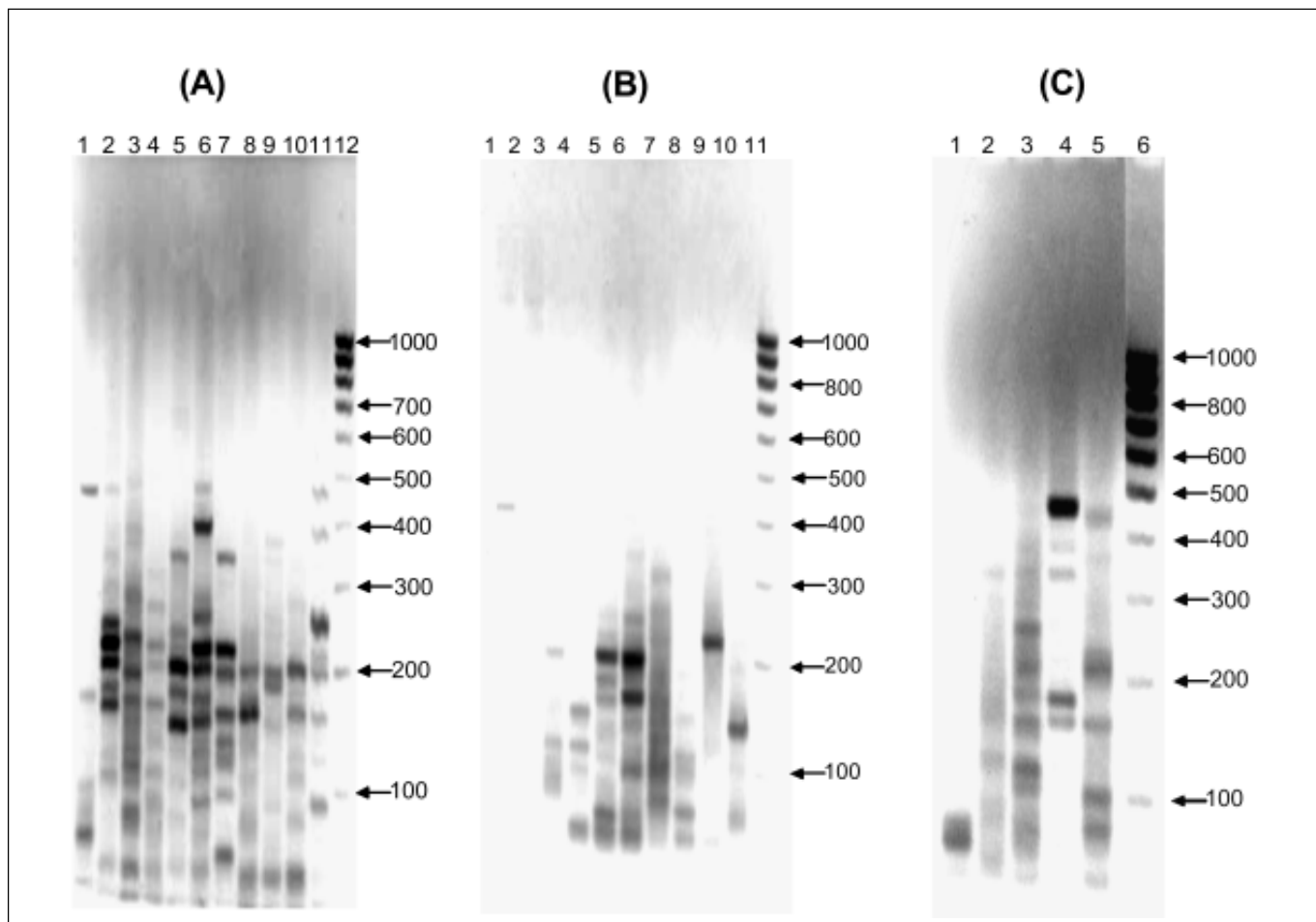
### Expansión clonal durante la infección por el HTLV-I

Los resultados de los ensayos de IPCR mostraron que los pacientes PET/HAM, ATL y portadores asintomáticos pre-

sentan estilos de integración proviral variables (figura 4). La expansión oligoclonal de clones celulares infectados se presentó tanto en pacientes PET/HAM como en portadores asintomáticos, resultado que contrastó con el encontrado en los pacientes ATL en quienes se observó un tipo de expansión tendiente a la monoclonalidad. El número de amplicones de IPCR fue significativamente mayor en pacientes PET/HAM ( $8.6 \pm 2.5$ ) en comparación con los pacientes ATL ( $2.8 \pm 3$ ) y los portadores asintomáticos ( $5.0 \pm 1.7$ ) ( $p < 0.004$ ). En el grupo de pacientes PET/MAH ubicados en un rango de edades de 40-60 años se registró el menor número de clones infectados con provirus de integración ( $6.4 \pm 1.1$ ), contrastando con lo encontrado en los pacientes más jóvenes ( $10.0 \pm 2.9$ ) ( $p < 0.019$ ) o en los pacientes mayores ( $11.5 \pm 2.1$ ) ( $p < 0.003$ ). No se encontraron diferencias en el número de amplicones de IPCR entre sexos o grupos étnicos.

### Estructura del sitio flanqueante de la integración proviral

Se estudió tanto la composición de bases como la identificación de secuencias que flanquean el sitio de integración de provirus del HTLV-I. En los pacientes PET/HAM, la región del DNA celular de 50 pares de bases que flanquea al correspondiente provirus HTLV-I, mostró una composición de 21% A, 21.2% T, 29.7% G y 27.9% C. Un análisis de su distribución de bases mostró en esa región una G en la posición 7 es la única base que se presenta invariable. El porcentaje del contenido GC en esta región flanqueadora fue de  $57.6 \pm 6.93\%$  el cual es significativamente más alto que el que se obtuvo en un grupo control de 60 secuencias celulares tomadas al azar del GenBank en las que el contenido en GC de  $42.2 \pm 6.3\%$  ( $p < 0.001$ ) (figura 5a).



**Figura 4.** Expansión clonal en individuos seropositivos para el HTLV-I. Electroforesis de los productos de IPCR de individuos seropositivos para el HTLV-I. (A) Pacientes PET/HAM (1-11); (12). Marcador de tamaño molecular de 100 bp. (B) Portadores asintomáticos (1-10); (11). Marcador de tamaño molecular de 100 bp. (C) Pacientes ATLL. (1-5); (6). Marcador de tamaño molecular de 100 bp. (bp: par de bases).



La composición de bases en una región de 50 nucleótidos del DNA celular que flanquea a la integración proviral en los pacientes ATL fue de 24.7% A, 19.6% T, 28.6% G y 27.5% C. No se encontró ninguna base particularmente significativa en ninguna posición. El promedio del contenido GC fue de  $56.1 \pm 12.9\%$ , que es significativamente mayor que en el grupo control de secuencias ( $p < 0.001$ ) (figura 5b).

Para los portadores asintomáticos la composición de bases fue 18.1% A, 14.6% T, 32.8% G y 34.3% C. No se encontraron bases significativas en ninguna posición. El contenido total de GC fue de  $67.2 \pm 27.8\%$ , el cual fue significativamente mayor que el contenido de GC en la secuencias

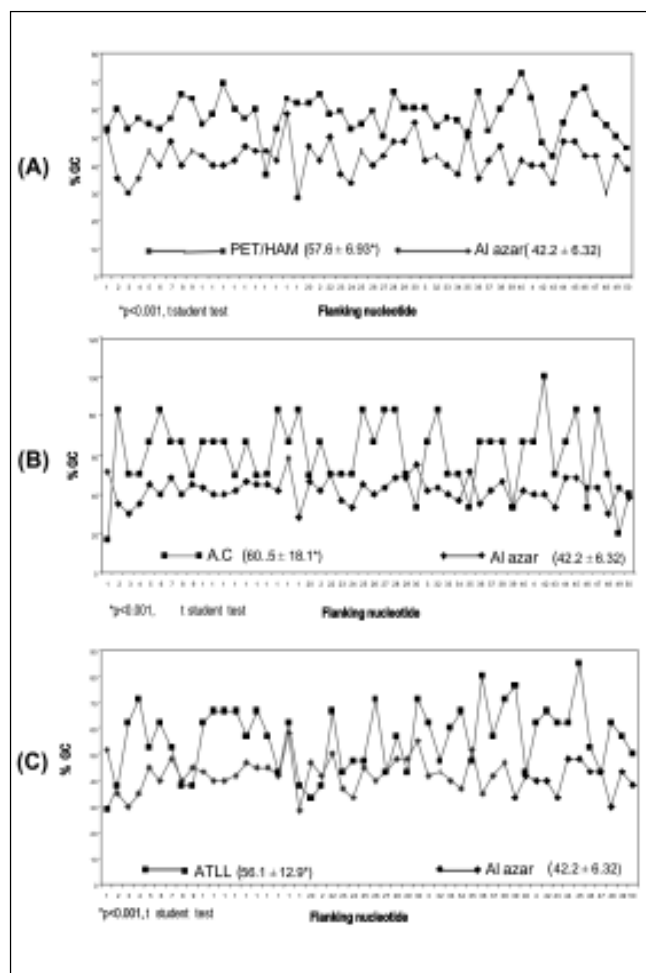
control ( $p < 0.001$ ) (figura 5c). La composición nucleotídica en las regiones flanqueadoras al provirus HTLV-I en el paciente superinfectado con *Srongiloides stercoralis* fue así: 17.9% A, 21.5% T, 29.8% G and 30.7% C. En éste se observó una tendencia similar en el contenido de GC, ( $60.5 \pm 18.1$ ) fue significativamente mayor que en la secuencia control ( $p < 0.01$ ). El grupo de pacientes PET/MAH que tenían mas de 60 años presentó una tendencia a integrar el provirus HTLV-I en regiones con un mayor contenido de GC que en los demás grupos de diferentes edades.

### Caracterización de las secuencias del DNA celular que flanquean el sitio de integración proviral

Noventa y uno por ciento (56/61) de los clones de IPCR de pacientes PET/HAM exhibieron un alto nivel de homología con secuencias de cDNA de varias líneas celulares tumorales y de tejidos normales. Utilizando el programa Mega Blast se localizó su posición cromosómica en el genoma humano. Las secuencias de nucleótidos de varios clones IPCR mostraron frecuente homología con una secuencia localizada en el cromosoma 9 (NT-019501) que apareó también con la secuencia de un cDNA correspondiente a un cDNA de fibroteoma ovárico (BF-058575) y a un cDNA de un adenocarcinoma de colon (BG-248551). Otras secuencias de inserción aparearon frecuentemente con la secuencia NT-010404-02 ubicada en el cromosoma 16. Los apareamientos respectivos con secuencias de cDNAs fueron con las secuencias cuyo código de acceso AW575915 corresponde a células B centrales germinales. Únicamente 3 secuencias flanqueadoras aparearon con elementos repetitivos VNTR.

La integración del provirus HTLV-I no se presentó en todos los cromosomas. La frecuencia de integración de provirus HTLV-I en pacientes PET/HAM se distribuyó asimétricamente en diferentes cromosomas. Los cromosomas con la más alta frecuencia de integración fueron el 8, el 9 y el 16. De otra parte los cromosomas 3, 17 y 19 y el X, presentaron una frecuencia intermedia de integración del provirus. En los cromosomas 4, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 22 y Y de los pacientes PET/HAM estudiados no se observó ninguna integración proviral.

El 42% (9/21) de las secuencias flanqueadoras al provirus HTLV-I en los pacientes ATLL mostraron un alto nivel de homología con secuencias de cDNA ubicadas principalmente en el cromosoma 18, algunas de ellas fueron las secuencias B1740308, BM509305 y HOA60-1-E3.R. En los portadores asintomáticos todas las secuencias de inserción del HTLV-I estuvieron el cDNAs especialmente ubicados en el cromosoma 9, entre ellas se destacan las secuencias BG765890, BG535750 and BG 244851.

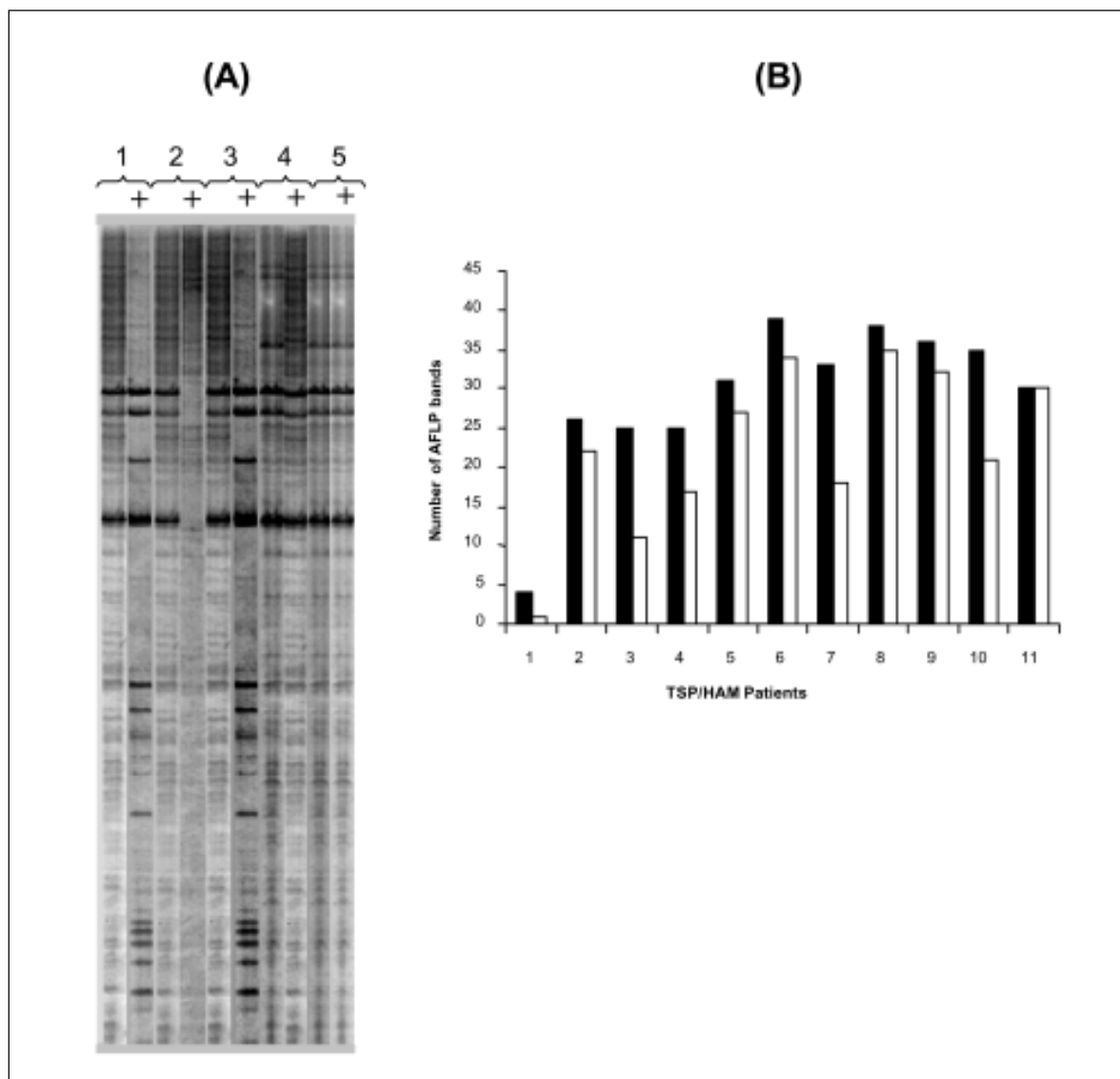


**Figura 5.** Comparación del contenido de GC entre regiones de 50 pb que flanquean al provirus HTLV-I y secuencias no virales del genoma humano. (A). Pacientes PET/HAM (B). Portadores asintomáticos (C). Pacientes ATL. Las diferencias en el contenido de G:C, se calcularon mediante una prueba de  $X^2$  con un nivel de significancia estadística mayor del 95%.

### Sustracción de fragmentos de AFLP

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos en los ensayos de AFLP sustractivo en 10 pacientes PET/HAM reveló la existencia de fragmentos de AFLP conteniendo secuencias de HTLV-I de tamaño molecular variable entre los individuos infectados por HTLV-I analizados (figura 6a). El análisis estadístico entre el número de bandas no hibridadas y el de hibridadas entre individuos fue

estadísticamente significativo ( $p < 0.006$ ). El análisis entre bandas AFLP hibridadas y no hibridadas para diez individuos que se incluyeron en el estudio mostró un número variable de éstas (figura 6b). De un total de 40 bandas AFLP registradas, se observaron patrones de hibridación de la sonda LTR con fragmentos de tamaño molecular común en el 100% (10/10) de los individuos; fueron significativamente sustraídos los fragmentos de tamaños moleculares aproximados de 300, 320 y 350 pb ( $p < 0.01$ ).



**Figura 6.** Ensayo de Hibridación Sustractiva de Fragmentos de AFLP (EHS AFLP) con una sonda 3'-LTR del HTLV-I. (A). Patrón electroforético de fragmentos AFLP del DNA de cinco pacientes PET/HAM que fueron hibridados con la sonda LTR y separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-Urea (6%) en condiciones no desnaturalizantes. (B). Distribución de fragmentos AFLP del DNA de 10 pacientes PET/HAM del Pacífico colombiano hibridados con la sonda LTR del HTLV-I.

## Discusión

En este trabajo se obtuvieron resultados con respecto a la biología molecular y la genómica estructural del proceso de integración del HTLV-I. En su conjunto se estableció un modelo de predictivo de la integración del HTLV-I, así como la demostración que el proceso de integración de este virus al genoma de células linfocitarias que no es completamente al azar. Además demostramos que la expansión clonal en células linfocitarias siendo mayor en los pacientes PET/HAM.

El modelo de la integración del HTLV-I obtenido en este trabajo, mostró similitudes con los dominios descritos para la integración del ASV (Bujacz *et al.*, 1996), sin embargo en el dominio carboxilo terminal, se observaron algunas diferencias en la distribución de los dominios de hélices beta plegadas. El haber obtenido un modelo computacional de la integración del HTLV-I se constituye en una herramienta predictiva tanto para poder evaluar efectos de mutaciones introducidas por mutagénesis sitio dirigida como para el desarrollo de nuevos fármacos para su utilización como antirretrovirales. En este sentido las actuales terapias antirretrovirales se han enfocado principalmente en las enzimas proteasa y transcriptasa reversa, pero los resultados no han sido satisfactorios porque siempre se producen mutaciones que le permiten al virus resistir a las drogas administradas. Por esta razón, el blanco terapéutico antiviral más promisorio es la integrasa.

Se obtuvieron datos sobre las características moleculares de las secuencias que flanquean muchos sitios de integración del provirus HTLV-I en linfocitos de sangre periférica de individuos naturalmente infectados. En términos generales, la característica común de las secuencias de 50 pb flanqueadoras 3' al provirus HTLV-I integrado fue su alto contenido de bases G y C, hecho que contrasta con el moderado contenido en bases GC que presentó un grupo de secuencias genómicas de igual extensión seleccionadas aleatoriamente de la base de datos del Genbank.

Estos resultados muestran que el HTLV-I integrado provoca una expansión oligoclonal de las células infectadas especialmente en pacientes PET/HAM, observación que concuerda con las observaciones reportadas por Yoshida *et al.*, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1988; Wattel *et al.*, 1995; Wattel *et al.*, 1996 & Cavrois *et al.*, 1996. El grado de expansión clonal que se observó en pacientes PET/HAM fue significativamente mayor que los observados tanto en los pacientes ATLL como en los individuos asintomáticos portadores de HTLV-I incluidos en el presente estudio. No obstante, el grado de expansión clonal

no se presenta de manera uniforme entre todos los pacientes PET/HAM, así, el subgrupo de pacientes PET/HAM de edad avanzada fue el que exhibió el más alto grado de expansión clonal. Cualquier posible explicación para este resultado debe considerar que la principal característica patológica de la enfermedad consiste en un proceso inflamatorio que ocurre en muchas áreas de la médula espinal. Puesto que la desmielinización es un evento que ocurre de manera progresiva y muy lentamente, es lógico inferir que la infección con HTLV-I en los individuos de edad avanzada ha debido progresar durante el transcurso de muchos años. Otras evidencias que dan soporte a una hipótesis de tal naturaleza lo constituyen las altas cargas provirales registradas en sangre periférica de pacientes PET/HAM y la existencia de una reacción cruzada específica de anticuerpos tipo IgG contra HTLV-I y una proteína de 98-100 kDa perteneciente a la médula espinal normal como lo han reportado García-Vallejo *et al.*, 2005. Con base en la presente evidencia experimental se sugiere que la infección con HTLV-I a largo plazo conduce a un empobrecimiento del normal funcionamiento de sistema inmunitario.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la integración del HTLV-I *in vivo* dentro del ADN de los individuos infectados no es un proceso que se verifique de manera aleatoria, resultados que concuerdan completamente con los obtenidos en los estudios publicados por Craigie, 1992; Leclercq *et al.*, 2000; Hann *et al.*, 1983; Salinas *et al.*, 1987 & Chou *et al.*, 1996. Específicamente se encontró que las secuencias de 50 pb que flanquean al provirus HTLV-I integrado tienen una gran riqueza en bases GC. Esta observación, basada en el análisis de las secuencias, coincide con las obtenidas en un estudio previo realizado por Zoubak *et al.*, 1994, mediante la técnica de fraccionamiento composicional del genoma humano. Estos autores mostraron que el provirus HTLV-I se integraba en los isocoros ricos en GC del genoma humano. El contenido de GC es una característica muy útil cuando se trata de discriminar diferentes regiones genómicas. En este sentido, el genoma humano se encuentra compartimentalizado en diferentes áreas con contenidos diferenciales en su composición nucleotídica, a las que Bernardi 1989 denominó isocoros (Cavrois *et al.*, 1996). Los isocoros en consecuencia, presentan variabilidad en su contenido de GC y es así como es posible diferenciar el componente rico en GC del genoma humano. Las observaciones realizadas en el presente trabajo muestran que el contenido de GC de las secuencias genómicas de 50 pb que flanquean los sitios de integración de los provirus HTLV-I es más alto en las secuencias que albergan un provirus integrado que en secuencias

equivalentes de individuos no infectados que fueron seleccionadas al azar. Mediante esta observación puede inferirse la existencia de un efecto que predispone para que la integración se verifique en los sitios ricos en GC y este efecto sería independiente del estado clínico de los individuos infectados, puesto que no se observaron diferencias en los contenidos de GC entre pacientes PET/HAM, ATLL, el individuo superinfectado con *S. stercoralis* y en los portadores asintomáticos. Estudios previos llevados a cabo en modelos animales por **Mooslehner et al.**, 1990, han mostrado que la conformación de la cromatina blanco constituye un factor importante para la integración de provirus y específicamente es promovida hacia las cercanías de las regiones transcritas. Puesto que se ha encontrado que las secuencias ricas en GC promueven un alto grado de curvatura en el ADN de la cromatina como lo demostraron **Leclercq et al.**, 2000, se puede proponer que las secuencias ricas en GC que flanquean al provirus HTLV-I integrado constituyen un parámetro crítico para discriminar los potenciales blancos de integración.

Los resultados obtenidos en este trabajo, constituyen una clara demostración de que las secuencias províricas de individuos seropositivos de diferentes regiones de Colombia, no se integraron aleatoriamente, sugiriendo que el proceso de integración puede estar dirigido por factores asociados a la secuencia.

Las observaciones hechas en el presente estudio muestran que las regiones flanqueadoras al provirus HTLV-I integrado no tienen una composición nucleotídica especialmente rica en AT. Este resultado está en abierta contradicción con las observaciones obtenidas por **Leclercq et al.**, 2000, quienes registran un alto contenido de nucleótidos AT para estas regiones flanqueadoras al provirus HTLV-I integrado. Otra diferencia sustancial que muestra ese estudio con el presente, es que solo el 33% de sus secuencias flanqueadoras al provirus HTLV-I integrado se ubicaron en unidades transcripcionales del genoma humano. Una explicación posible para la discrepancia puede radicar en que los individuos analizados aquí, provenían de la región del Pacífico colombiano, sobre los cuales, como ya se ha demostrado en el presente estudio filogenético pertenecen al subgrupo B japonés, a diferencia de los individuos de Martinica que esos autores estudiaron y que pertenecerían muy probablemente al subgrupo cosmopolita A. En consecuencia, se postula que la diferencia genética de los virus podría incidir en el sitio blanco de la integración del retrovirus. Otra de las posibles explicaciones que justifican la discrepancia estriba en que para realizar el presente estudio se extrajo directamente el DNA de linfocitos de individuos infecta-

dos, sin pasar por las etapas de cultivo de linfocitos que realizaron esos autores. Ese hecho indudablemente permite que los virus se repliquen en condiciones diferentes a las fisiológicas con las correspondientes consecuencias en la movilidad que ellos presentan entre los genomas de las células sometidas a cultivo.

En el presente estudio se hizo una estratificación de los individuos naturalmente infectados en varios grupos con base en su diagnóstico clínico. Analizando el tipo de secuencias que flanquean el sitio de integración del provirus HTLV-I se observó que muchos de los clones fueron identificados como correspondientes a muchos cDNAs de diferentes tejidos. Así, el 91% de las secuencias flanqueadoras al provirus HTLV-I en pacientes PET/HAM pudieron ser ubicadas dentro de unidades transcripcionales. Un 42% de las secuencias flanqueadoras lo hicieron dentro de unidades transcripcionales en pacientes ATLL y la totalidad de las secuencias flanqueadoras al provirus HTLV-I se ubicaron en dichas unidades en los portadores asintomáticos. Sin embargo, solo 3 secuencias repetitivas VNTR pudieron ser identificadas en pacientes PET/HAM y ninguna en pacientes ATLL o en portadores sanos. Estos resultados sugieren que existe una posible asociación entre los sitios de integración y la patología subyacente. Esto constituye una fuerte evidencia que recalca la necesidad de explorar tal relación.

En el presente estudio se pudo determinar que los loci cromosómicos donde se presenta más favorablemente la integración del HTLV-I, están localizados en los cromosomas 8, 9 y 16. Resultados similares que soportan los presentes fueron obtenidos en trabajos previos llevados a cabo por **Glukhova et al.**, 1999, quienes mediante el uso de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* evidenciaron la preferencialidad de la integración del provirus HTLV-I hacia loci cromosómicos ubicados en los cromosomas 4, 6, 9, 15 y 16.

A pesar que la mayoría de las regiones del genoma humano pueden ser accesibles a la maquinaria de la integrasa; este proceso tiene una direccionalidad orientada hacia unos pocos cromosomas. Estos resultados implican la existencia de un sitio común de integración que está favorecido como un sitio caliente de integración del provirus HTLV-I. Este resultado nuevamente constituye otra vez una prueba de que el HTLV-I no se integra aleatoriamente a nivel de secuencia ni tampoco a nivel cromosómico.

Los estudios previos en los que se ha intentado construir un panorama genómico de la integración proviral se

basaron esencialmente en la hibridación por Southern Blot y en el IPCR; estas dos metodologías demandan procedimientos de muchos pasos que requieren caracterización posterior por secuenciación. De otra parte no reflejan el polimorfismo en la integración de secuencias provirales en el genoma de la célula infectada. En este trabajo por primera vez se desarrolló y probó un método que permitió analizar la localización genómica de secuencias provirales empleando una metodología de barrido genómico de polimorfismos como es el AFLP.

El análisis estadístico efectuado entre el número de amplicones hibridados dentro de cada individuo y entre individuos portadores del HTLV-I mostró diferencias estadísticamente significativas. Este resultado es una evidencia fuerte que permite sustentar la hipótesis de un número variable de blancos de integración en el genoma de la célula infectada, el cual fue variable para los individuos PET/HAM incluidos en este estudio.

Este método se convierte en una herramienta poderosa para analizar a nivel genómico el perfil de integración que tiene el DNA de una célula infectada puesto que el método no requiere más que los protocolos de AFLP clásico. Sería un complemento para estudiar el patrón de integración con el progreso de la infección sistémica en los individuos que permitiría un seguimiento más detallado de la infección y su progreso con la enfermedad. Y puede además ser extrapolado al estudio de la integración de otros retrovirus humanos tales como HTLV-II y HIV-1 y 2 en los que sería una herramienta predictiva en la valoración de la efectividad de terapias antirretrovirales.

La integración del DNA proviral es un proceso crucial en el ciclo de vida de todo retrovirus. Se ha estudiado en detalle los diferentes aspectos de la integración de provirus HTLV-I en pacientes PET/HAM y ATLL y en portadores asintomáticos. En su conjunto los resultados demostraron que el estilo de integración y sus consecuencias a nivel genómico y celular son diferentes en cada estadio de la infección. Fue interesante obtener resultados que demostraron que en los pacientes PET/HAM existe un agresivo proceso de expansión clonal y un amplio rango de integración proviral al DNA de la células infectadas, este hecho refleja el polimorfismo integracional en regiones ricas en GC no al azar que se observó para los pacientes PET/HAM que fueron estudiados. Los resultados obtenidos en este trabajo, han permitido continuar las investigaciones en el sentido de poder ensayar principios activos naturales derivados del café, que puedan inhibir selectivamente la integrasa del HTLV-I. Puedo afirmar que en un plazo corto tendremos resultados que nos permitirán abordar la infección con el HTLV-I bajo un nuevo

enfoque terapéutico, pudiendo ser este de bajo costo y accesible a la población infectada por el HTLV-I tanto en nuestro país como en otras regiones del mundo.

### Agradecimientos

A todos mis colaboradores quienes a lo largo de más de ocho años de trabajo, lograron acumular un conocimiento suficiente para poder tener un panorama más amplio de la infección por este virus así como disponer actualmente de opciones terapéuticas potenciales para enfocar un tratamiento. En especial a Martha Domínguez, Jesús Cabrera, Adalberto Sánchez y todos mis estudiantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. A todas aquellas personas infectadas por el virus quienes mediante su colaboración han permitido estudiar en detalle tanto la infección como los aspectos moleculares de de este importante retrovirus que constituye un problema serio de Salud Pública en nuestro País. A mis amigos Max Essex, Yoshito Eizuru, Suminori Akiba, Vladimir Zaninovic, Boris Renjifo e Isabella Borrero con quienes pude trabajar de manera directa en los problemas del HTLV-I. A Liliana Castro asesora y Luz Mary Mejía secretaria de la Subdirección de Programas de Desarrollo Científico y Tecnológico de Colciencias. A la Fundación Fogarty/NIH, a Colciencias, Fundación Banco de la República, Colombia, el Ministerio de Cultura y Educación del Japón, la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard, la Universidad de Kagoshima y muy especialmente a la Universidad del Valle sin las cuales no hubiese tenido el apoyo financiero y logístico para realizar las investigaciones.

### Bibliografía

- Andrake M. & A. Skalka.** 1996. Retroviral integrase, putting the pieces together; *Journal of Biological Chemistry*. 271, 19633-19636.
- Balcázar N, Sánchez G. & F. García-Vallejo.** 2003. Sequence and phylogenetic analysis of Human T-Lymphotropic Virus type 1 from Tumaco, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 641-648.
- Bernardi, G.** 1989. The isochore organization of the human genome. *Annu Rev. Genet.* 23: 637-661.
- Blattner W.A., R.J. Biggar, S.H. Weiss, J.W. Clark, J.J. Goedert.** 1985. Epidemiology of human lymphotropic retroviruses: an overview. *Cancer Res.* (9 Suppl): 4598s-4601s.
- Bujacz, G., M., Jaskolski, J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, R.A. Katz, & A.M. Skalka.** 1996. The catalytic domain of avian sarcoma virus integrase: conformation of the active site residues in the presence of divalent cations. *Structure* 4:89-96.
- Cabrera J. & F. García-Vallejo.** 2000. Aumento del número de amplicones obtenidos por IPCR en el ADN de personas seropositivas para HTLV-I afectadas con PET/HAM. *Colombia Médica*. 31: 169-175.

- Cavrois M., A. Gessain, S. Wain-Hobson & E. Wattel.** 1996. Proliferation of HTLV-I infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. *Oncogene*. 12: 2419-2423.
- Coffin JM.** 1992. Retroviridae and their replication. In: *Virology*. Fields BN, Knipe DM., (eds). New York. Raven Press, pp. 1437.
- Cortés A. & F. García.** 1996. Prevalencia de marcadores para infecciones transmisibles por transfusión en donantes voluntarios. *Colombia Médica*. 27: 3-10.
- Craigie, R.** 1992. Hotspots and warm spots: integration specificity of retroelements. *Trends Genet.* 8(6):187-90.
- Chávez M, M.C. Domínguez, A. Blank, M. Quintana, Y. Eizuru & F. García-Vallejo.** 2004. Reconstrucción de la evolución molecular de la infección actual por el Virus Linfotrópico Humano Tipo I (HTLV-I) en Colombia. *Biomédica*. 24: 65-72.
- K.S. Chou, A. Okayama, L.J. Su, T.H. Lee, & M. Essex.** 1996. Preferred nucleotide sequence at the integration target site of human T-cell leukemia virus type I from patients with adult T-Cell leukemia. *Int J Cancer*, 3: 65: 20-24.
- Dangond, F., J.S. Daza, A. Rosania, et al.** 1995. Tropical Spastic Paraparesis in the Caribbean coast of Colombia. *J. Trop. Med. Hyg.* 52:155-158.
- Domínguez M. C., A. Castillo, J. Cabrera, Y. Eizuru, S. Akiba & F. García-Vallejo.** 2002. Envelope sequence variation and phylogenetic relations of human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV) Type I from endemic areas of Columbia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 887-890.
- Furukawa Y., M. Yamashita, K. Usuku, S. Izumo, M. Nakagawa, M. Osame.** 2000. Phylogenetic Subgroups of Human T cell Lymphotropic Virus (HTLV-I) Type I in the *tax* gene and their association with different Risks for HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *J Infect Dis*. 182:1343-1349.
- García-Vallejo F., M. Chávez, M.C. Domínguez, A. Blank.** 2000. Microagregación genética y geográfica de aislados del virus linfotrópico humano Tipo I (HTLV-I) en zonas endémicas del suroccidente de Colombia. *Colombia Médica*. 31: 110-117.
- \_\_\_\_\_ & **V. Zaninovic.** 2002. Origen y diseminación del virus Linfotrópico Humano de células T Tipo I (HTLV-I) en Colombia. *Médica Sánitas* 5: 44-63.
- García-Vallejo F.** 1996. Molecular and immunological characteristics In the pathogenesis of tropical spastic paraparesis- HTLV-I associated myelopathy (TSP/HAM). *Revista Ciencia y Cultura* 48:351-358.
- \_\_\_\_\_, **R. Bonilla, G. Gallego, M. Rugeles & I. Borrero.** 1992. Amplificación de segmentos de DNA del virus linfotrópico humano (HTLV-I) en pacientes con paraparesia espástica tropical y seropositivos asintomáticos. *Colombia Médica*. 23:50-56.
- \_\_\_\_\_, **M.C. Domínguez & O. Tamayo.** 2005. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38:241-250.
- \_\_\_\_\_, **B. Renjifo, M. Essex.** 1995. Nucleotide sequence variation in the envelope of patients with tropical spastic paraparesis/ Human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *AIDS Res Hum. Retrovirol.* 10: 283.
- Gessain A., F. Barin, J.C. Vermant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, G. de The.** 1985. Antibodies to Human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 402.
- Glukhova LA., S.V. Zoubak, A.V. Rynditch, G.G. Miller, I.V. Titova, N. Vorovyeva, Z.V. Lazurkevitch, A.S. Graphodatskii, A.A. Kushch, & G. Bernardi.** 1999. Localization of HTLV-1 and HIV-1 proviral sequences in chromosomes of persistently infected cells. *Chromosome Res.* 7:177-183.
- Goff SP.** 1990. Integration of retroviral DNA into the genome of he infected cell. *Cancer Cells*. 2:172-178.
- \_\_\_\_\_, 1992. Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* 26: 227-544.
- Hann B. et al.** 1983. Common site of integration of HTLV in cells of three patients of with mature T Cells leukemia/Lymphoma. *Nature* 303: 253-256.
- Hinuma Y., K. Nagat, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K.I. Kinoshita, S. Shirakawa, I. Miyoshi.** 1981. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 6476-6480.
- Ijichi S., K. Tajima, V. Zaninovic, F.E. Leon-S, Y. Katahira, S. Sonoda, T. Miura, M. Hayami, W.W. Hall.** 1993. Identification of human T cell leukemia virus type Iib infection in the Wayu, an aboriginal population of Colombia. *Jpn J Cancer Res.* 84: 1215-1218.
- Katzman M. & R.A. Skalka.** 1999. Substrate recognition by retroviral integrases. *Adv Virus Res.* 52: 371-395.
- Kimura I, T. Tsubota, S. Tada, J. Sogawa.** 1986. Presence of antibodies against adult T cell leukemia antigen in the patients with chronic respiratory diseases. *Acta Med Okayama.* 40: 281-284.
- Kyte J. & R.F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- La Grenade L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, W. Blattner.** 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. 336(8727): 1345-1347.
- Leclercq I, F. Mortreux, M. Cavrois, A. Leroy, A. Gessain, S. Wain-Hobson & E. Wattel.** 2000. Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vivo. *J Virol* 74: 2305-2312.
- \_\_\_\_\_, **A.S. Gabet, C. Jonsson, & E. Wattel.** 2000. Basis of HTLV type I target site selection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000. 16(16): 1653-1659.
- Leon-Monzon M., I. Illa & M.C. Dalakas.** 1994. Polymyositis in patients infected with human T-cell leukemia virus type I: the role of the virus in the cause of the disease. *Ann Neurol.* 36: 643-649.

- Letunic I, L. Goodstadt, N.J. Dickens, T. Doerks, J. Schultz, R. Mott, F. Ciccarelli, R.R. Copley, C.P. Ponting, & P. Bork.** 2002. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res* 30: 242-244.
- Mochizuki M., T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Takatsuki, K. Yoshimura, M. Shirao, S. Nakashima, S. Mori, S. Araki & N. Miyata.** 1992. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res.* **83**(3): 236-239.
- Mooslehner K., U. Karls, & K. Harbers.** 1990. Retroviral integration sites in transgenic Mov mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J Virol.* **64**: 3056-3058.
- Mueller, N.** The epidemiology of HTLV-I infection. 1991. *Cancer Causes Control.* **2**: 37-52.
- Mueller B., & H.G. Krausslich.** 1999. Characterization of human T-cell leukemia virus type I integrase expressed in *Escherichia coli*; *Eur. J. Biochem.* **259**, 79-87.
- Nishioka K., I. Maruyama, K. Sato, I. Kitajima, Y. Nakajima, M. Osame.** 1989. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet.* **1**:441.
- Ohshima K., M. Kikuchi, Y. Masuda, Y. Sumiyoshi, F. Eguchi, H. Nohtai, M. Takeshita & N. Kimura.** 1992. Human T-cell leukemia virus type I associated lymphadenitis. *Cancer.* **69**: 239-248.
- Osame M., K. Usuku, S. Izumo et al.** 1986. HTLV-I associated myelopathy a new clinical entity. *Lancet* **1**: 1031-1032.
- Poiesz BJ., F.W. Ruscetti, A.F. Gadzar, P.A. Bunn, J.D. Minna, & R.C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of Type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T.cell lymphoma. *Proc. Natl. Accad. Sci. USA.* **77**: 7415.
- Quintana M, J. Villalobos, M.C. Domínguez, O. Tamayo & F. García Vallejo.** 2004. Estudio de la seroprevalencia de la infección por los virus linfotrópicos humanos (HTLV) I y II en poblaciones del departamento de Córdoba, Colombia. *Colombia Médica.* **35**: 22-30.
- Renjifo B., L. Soto, F. García-Vallejo, & M. Essex.** 1996. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) molecular genotypes and disease outcome. *AIDS Res Hum. Retrovirol.* **13**: s146-s153.
- Renjifo B. J. Osterman, I. Borrero & M. Essex.** 1995. Nucleotide sequence of Human T-Lymphotropic virus Type I (HTLV-I) from a family cluster with tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. *Res Virol.* **146**: 93-99.
- Salinas J. et al.** 1987. Nonrandom distribution of MMTV proviral sequences in the mouse genome. *Nucleic Acid Res.* **15**:3009-3022.
- Sambrook J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press.
- Sandmeyer, S.B., L.J. Hansen & D.L. Chalker.** 1990. Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu. Rev. Genet.* **24**:491-518.
- Schultz J., R.R. Copley, T. Doerks, C.P. Ponting, & P. Bork.** 2000. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains *Nucleic Acids Res,* **28**: 231-234.
- Seiki M., S. Hatari, Y. Hirayama & M. Yoshida.** 1983. Human adult T-cell leukemia virus : complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 3618-3622.
- Shimoyama, M.** 1991. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* **79**: 428-437.
- Takemoto S., M. Matsuoka, K. Yamaguchi & K. Takatsuki.** 1994. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood.* **84**: 3080-3085.
- Tangy, F.** 1996. *Molecular Biology of HTLV-I.* In: HTLV Truths and questions. Zaninovic V. (ed)., Fundación MAR, Colciencias, Cali, Colombia. pp 1.
- Terada K., S. Katamine, K. Ehuchi, R. Moriuchi, M. Kita, H. Shimada, M. Shimoyama.** 1991 **I. Yamashita, K. Iwata.** 1994 Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. *Lancet.* **344**: 1116-1119.
- Trujillo CM., M. Concha, A. Muñoz, G. Bergonzoli, C. Mora, I. Borrero, C.J. Gibbs & C. Arango.** 1992. Seroprevalence and cofactor of HTLV-I infection in Tumaco. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:651-657.
- Uchiyama, T.** 1997. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol.* **15**:15-37.
- \_\_\_\_\_, **J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, H. Uchino.** 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* **50**(3): 481-492.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper et al.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.
- Watanabe T.** 1997. HTLV-I associated diseases. *Int J Hematol.* **66**: 257-278.
- Wattel E, M. Cavrois, A. Gessain, & S. Wain-Hobson.** 1996. Clonal expansion of infected cells –a way of life for HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* (suppl. 1): 92-99.
- \_\_\_\_\_, **J.P. Vartarian & S. Wain-Hobson.** 1995. Clonal expansion of HTLV-I infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* **69**:2863-2868.
- World Health Organization.** 1989. Report: Scientific Group on HTLV-I infections and Associated Diseases, Kagoshima, December 10-15, Geneva, WHO.
- Yamaguchi K., T. Kiyokawa, K. Nakada, L.S. Yu, N. Asou, T. Ishii, I. Sanada, M. Seiki, M. Yoshida, E. Matutes et al.** 1988. Polyclonal integration of HTLV-I proviral DNA in lymphocytes from seropositive individuals: an intermediate state between the healthy carrier state and smouldering ATL. *Br J Haematol.* **68**:169-174.
- Yoshida M., I. Miyoshi, Y. Hinuma.** 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult

T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 79: 2031-2035.

\_\_\_\_\_, **M. Osame, H. Kawai, M. Toita, N. Kuwasaki, Y. Nishida, Y. Hiraki, K. Takahashi, K. Nomura, S. Sonoda et al.** 1989. Increased replication of HTLV-I in HTLV-I associated myelopathy. Ann. Neurol. 26: 331.

**Yoshima M., M. Seiki, K. Yamguchi & K Takatsuki.** 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. Proc Natl Acad Sci U S A. **81**(8): 2534-2537.

**Zaninovic V., R. Bioj6 & P. Barreto.** 1981. Paraparesia esp6stica del pac6fico. Colombia. M6dica. 12: 111-117 a.

**Zaninovic V. et al.** 1986. El virus HTLV-I como posible causa de la paraparesia esp6stica tropical del pac6fico. Col. Med. 17: 2-8.

**Zoubak S., J.H. Richardson, A.V. Rynditch, P. Hollsberg, D.A. Hafler, E. Boeri, A.M. Lever & G. Bernardi.** 1994. Regional specificity of HTLV-I proviral integration in the human genome. Gene. 143: 155-163.

Recibido el 20 de octubre de 2005.

Aceptado para su publicaci3n el 9 de noviembre de 2005.