

**EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS REGULADORAS CIRCULANTES (T Y B) Y FUNCIONES EFECTORAS DE LOS LINFOCITOS T DE INDIVIDUOS CON PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL ASOCIADO AL VIRUS HTLV-I (PET/HAM)**



**YULIETH CRISTINA BERMÚDEZ BURBANO  
ANGIE VANESSA CAICEDO PAZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA,  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

**EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS REGULADORAS CIRCULANTES (T Y B) Y FUNCIONES EFECTORAS DE LOS LINFOCITOS T DE INDIVIDUOS CON PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL ASOCIADO AL VIRUS HTLV-I (PET/HAM)**



**YULIETH CRISTINA BERMÚDEZ BURBANO  
ANGIE VANESSA CAICEDO PAZ**

**Informe final en la modalidad de investigación presentado para optar el título de  
Biólogas**

**DIRECTORA**

**Victoria Eugenia Niño, Ph.D**

**CODIRECTORA**

**Rosa Amalia Dueñas Cuellar, Ph.D**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA,  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BILOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

## **Nota de aceptación**

El director y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

---

Firma de la Directora Victoria Eugenia Niño

---

Firma del Jurado Harold Jofre Bolaños

---

Firma del William Orlando Castillo

Popayán, 27 de abril de 2018

## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

*Que es el que hace posibles todas las cosas. Gracias doy a Él por la vida que me ha dado y la motivación de luchar cada día por mis ideales.*

### **A mi padre Helder.**

*Por acompañarme y apoyarme en cada momento de mi vida, por ser un ejemplo a seguir, por enseñarme a luchar siempre por lo que quiero, por su gran amor y todos los sacrificios que has hecho por nuestra familia.*

### **A mi madre Yolanda.**

*Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser mejor persona cada día, por su amor, comprensión y entrega, por enseñarme a luchar día a día por conseguir lo que quiero y sobre todo por ser la gran mujer que es.*

### **A mis familiares.**

*A mis hermanas Martha y Xiomara por ser mis amigas, por brindarme todo su amor y cariño, por haberme dado el mejor regalo, ser la tía de Emmanuel y Ana Sofía; a mi abuela, tíos y primos por todo su apoyo incondicional.*

### **A mis amigos.**

*Por estar siempre conmigo, por apoyarme en todo momento, por alentarme, por todas las risas y sueños compartidos: Paola Martínez y Diana Fernández, mis mejores amigas; Andrés Olaya, Felipe Orozco, Cristian Lasso, Fernanda Quiñones, Cristina Barragán, Daniel Muñoz, Cristian Franco y Andrés Murcia mis compañeros de carrera e historias de nunca olvidar.*

*En especial, a mi amiga y compañera de trabajo de grado, Vanessa Caicedo, por brindarme su apoyo, por animarme, por sus consejos y por soportarme durante este tiempo.*

**YULIETH CRISTINA BERMÚDEZ BURBANO**

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, quien ha sido mi guía, compañera, amiga, soporte y motor de vida, gracias por tantas enseñanzas, por ser un ejemplo de lucha, perseveración y éxito, te dedico cada logro en mi carrera, y en especial este, que a pesar de los obstáculos, conseguimos juntas, gracias por tu inmenso amor, mi admiración hacia ti es infinita.*

*A mis familiares, por guiarme a partir de sus experiencias, me han transmitido que todo es posible si te esfuerzas, gracias por su cariño incondicional; especialmente a mi abuelita, a mi hermano y a mis tíos: Carlos, Leonor, Nubia y José.*

*A mis amigos, por su apoyo incondicional a lo largo de este camino, por las risas, anécdotas e innumerables vivencias que al pasar el tiempo, perdurarán en nuestras memorias; especialmente a: Andrés, Aura, Fabián y Yulieth.*

**ANGIE VANESSA CAICEDO PAZ**

## AGRADECIMIENTOS

*Nuestro más sincero agradecimiento al Grupo de investigación y semillero de investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (SYEi), por permitirnos hacer parte de su gran familia. Al Doctor Julio César Klínger, por sus valiosas enseñanzas y por hacernos sentir siempre como en casa; a los estudiantes de medicina Cristhian Rivera y Juan Sebastián Rodríguez, por estar siempre dispuestos a ayudarnos y por sus aportes a este trabajo.*

*A la fundación banco de la república por su aporte financiero, el cual nos permitió desarrollar este trabajo.*

*A nuestra directora de trabajo de grado, Victoria Eugenia Niño, codirectora, Rosa Amalia Dueñas y asesora, Gloria Ávila, por poner su confianza en nosotras, por ser nuestras guías y brindarnos su apoyo incondicional, por sus consejos, por transmitirnos sus conocimientos a largo del proceso en la formación como biólogas e investigadoras.*

## CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
3.1. VIRUS DEL HTLV-I.....	17
3.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR HTLV-I .....	19
3.3. PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL ASOCIADA AL VIRUS DE HTLV-I (PET/HAM).....	20
3.4. FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A PET/HAM .....	20
3.4.1. Carga proviral .....	20
3.4.2. Genética del huésped .....	21
3.5. FISIOPATOLOGÍA .....	22
3.6. PAPEL DE LAS CÉLULAS T EN EL DESARROLLO DE PET/HAM .....	24
3.6.1. Linfocitos TCD4 <sup>+</sup> .....	24
3.6.2. Linfocitos TCD8 <sup>+</sup> .....	24
3.7. PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs) EN EL DESARROLLO DE PET/HAM .....	24
3.8. PAPEL DE LAS CÉLULAS B REGULADORAS (Bregs).....	26
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	27
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>27</b>
5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	27
5.1.1. Criterios de inclusión .....	27
5.1.2. Criterios de exclusión .....	28
5.1.1. Criterios de inclusión .....	28

5.1.2. Criterios de exclusión .....	29
5.2. PROCEDIMIENTOS .....	29
5.2.1. Toma de muestra de sangre venosa periférica .....	29
5.2.2. Determinación de Infección por el virus HTLV-I .....	29
5.2.3. Extracción de células mononucleares de sangre periférica .....	29
5.2.4. Fenotipificación de las subpoblaciones de células Treg.....	29
5.2.5. Fenotipificación de las subpoblaciones de células Breg .....	30
5.2.6. Cuantificación de células T activadas y senescentes.....	31
5.2.7. Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares .....	31
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	32
6.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS T Y B REGULADORAS CIRCULANTES .....	34
6.2.1. Cuantificación de células T reguladoras (Treg) CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> FOXP3 <sup>+</sup> en pacientes con PET/HAM y en controles sanos .....	34
6.2.2. Cuantificación de la frecuencia de las células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> DPI <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD73 <sup>+</sup> en pacientes con PET/HAM y controles sanos .....	35
6.2.3. Cuantificación de la frecuencia de células B reguladoras (Breg) circulantes .....	37
6.2.4. Cuantificación de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$ e IL-4.	39
6.2.5. Comparación de la relación entre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ sobre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> IL4 <sup>+</sup> .....	42
6.2.6. Comparación de la relación entre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ y CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ sobre el porcentaje de células Bregs .....	43
6.2.7. Cuantificación de la frecuencia de células T activadas y senescentes .....	43
<b>7. DISCUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>



## LISTA DE TABLAS

TÍTULO	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de Treg	29
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de Breg	29
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de T activación	30
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de citoquinas	31
<b>Tabla 5.</b> Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con PET/HAM y controles sanos	32
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de fenotipos de células T reguladoras en pacientes con PET/HAM	45
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de fenotipos celulares en pacientes con PET/HAM comparado con controles sanos.	46

## LISTA DE FIGURAS

TÍTULO	Pág..
<b>Figura 1.</b> Infección por el virus HTLV-I modificada de <b>Bangham et al. (2015a)</b>	17
<b>Figura 2.</b> Representación del mecanismo mediante el cual se genera la lesión del tejido nervioso en la PET/HAM modificada de <b>Bangham et al. (2015a)</b>	22
<b>Figura 3.</b> Cuantificación mediante citometría de flujo de células Treg con fenotipo CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> FOXP3 <sup>+</sup> en células mononucleares de sangre periférica.	33
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	34
<b>Figura 5.</b> Caracterización mediante citometría de flujo para células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> DPI <sup>+</sup> .	34
<b>Figura 6.</b> Caracterización mediante citometría de flujo para células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD73 <sup>+</sup> .	35
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> DPI <sup>+</sup> (A) y CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD73 <sup>+</sup> (B)	36
<b>Figura 8.</b> Cuantificación de células Breg con fenotipo CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup> en células mononucleares de sangre periférica.	37
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de células Breg CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>h</sup>	38
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de la frecuencia de linfocitos CD4 <sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ e IL-4.	39
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de la frecuencia de linfocitos CD8 <sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ e IL-4	40
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ e IL-4	41
<b>Figura 13.</b> Relación del porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ / CD4 <sup>+</sup> IL4 <sup>+</sup>	41
<b>Figura 14.</b> Relación del porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ / CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup> y CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ /CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>hi</sup> CD24 <sup>hi</sup>	42
<b>Figura 15.</b> Cuantificación mediante citometría de flujo de las subpoblaciones celulares CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> .	43
<b>Figura 16.</b> Cuantificación mediante citometría de flujo de las subpoblaciones celulares CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	44
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de células T activadas y senescentes	45

## **ANEXOS**

<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO A.</b> Consentimiento informado	61
<b>ANEXO B.</b> Encuesta realizada a pacientes y controles	65
<b>ANEXO C.</b> Protocolo integrado	68
<b>ANEXO D.</b> Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con PET/HAM positivos y PET/HAM negativos	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

HTLV-I: virus *linfotrópico humano tipo 1*

PET: Paraparesia Espástica Tropical

PET/HAM: Paraparesia Espástica Tropical asociado al virus HTLV-I

Treg: Células T reguladoras

nTreg: Celulas T reguladoras naturales

TCD4: Linfocitos T CD4

TCD8: Linfocitos T CD8

FoxP3: Factor de transcripción

DPI: proteína inductora de muerte celular 1

Breg: Células B reguladoras

IFN- $\gamma$ : Citoquina Interferón- $\gamma$

SNC: Sistema Nervioso Central

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$

LCR: Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

IL-2: Interleuquina 2

IL-3: Interleuquina 3

IL-6: Interleuquina 6

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

PBS: Buffer fosfato salino

## RESUMEN

El virus *linfotrópico humano tipo 1* (HTLV-I) es un retrovirus intracelular que infecta principalmente células T. Las personas que lo padecen pueden permanecer asintomáticas durante años; sin embargo, hay quienes desarrollan enfermedades inflamatorias como la Paraparesia Espástica Tropical (PET) o *HTLV-I associated myelopathy* (HAM) denominada PET/HAM. Esta enfermedad progresiva y crónica se caracteriza por generar parálisis espástica, la cual es altamente incapacitante. Los eventos que desencadenan esta patología no se conocen con claridad, pero se ha propuesto que al menos en el caso de la PET/HAM, una respuesta inmunológica tipo Th1 exacerbada y una alta carga viral, son las responsables del daño neurológico observado en los pacientes. En consecuencia, se presentan irregularidades en los procesos de homeóstasis de la respuesta inmune, los cuales están comandados por las células reguladoras. Poco se conoce sobre el papel de estas células en la fisiopatología de la PET/HAM, por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la frecuencia de las células T y B reguladoras circulantes en pacientes infectados con HTLV-I que desarrollan PET/HAM e individuos sanos. Para esto, células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles fueron aisladas para cuantificar el porcentaje de células T reguladoras (Treg) ( $CD4^+/CD25^{hi}/FOXP3^+$ ,  $CD4^+/CD25^{hi}/CD73^+$  y  $CD4^+/CD25^{hi}DPI^+$ ) y B reguladoras (Breg) ( $CD19^+/CD24^{hi}/CD38^{hi}$ ). Simultáneo a ello, se determinó el perfil de respuesta inmunológica tipo Th1 y Th2, así como el estado de activación y senescencia mediante la cuantificación de la expresión de las moléculas HLADR y CD57 en células  $TCD4^+$  y  $TCD8^+$ , respectivamente. A partir de los datos obtenidos se realizaron análisis comparativos entre los diferentes linajes celulares en pacientes y controles, en éstos se observó diferencias significativas en la frecuencia de células B reguladoras, donde los pacientes presentaron menor porcentaje en relación a controles (media= 2.96, IQR [1.92-4.45] vs media= 7.25 IQR [4.27-10.09]; valor de  $p < 0,05$ ); En contraste, los pacientes presentaron mayor porcentaje de linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  productores de  $IFN-\gamma$  en relación con los controles (%  $CD4^+$  media= 14.36, IQR [2.99-23.79] vs media= 3.041, IQR [2.25-5.35] y %  $CD8^+$  media= 24.37, IQR [4.99-47.03] vs media= 4.35, IQR [1.51-8.34]; valor de  $p < 0,05$  para ambos casos). Así mismo, se observó mayor porcentaje de células  $CD4^+$  productoras de IL-4 en pacientes comparado con controles (media= 14.10, IQR [8.65-17.21] vs media= 9.81, IQR [1.90-11.74]; valor de  $p < 0,05$ ). No se encontró diferencia estadística en los otros parámetros analizados (expresión de CD57, HLADR, DPI, CD73). En conclusión el bajo porcentaje de Breg en pacientes sugiere que estas células podrían ejercer un papel importante en el control de la respuesta inflamatoria en PET/HAM, ya que estos niveles bajos contrastan con altos porcentajes de células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  productoras de  $IFN-\gamma$ .

**Palabras claves:** paraparesia espástica, virus HTLV-I, células T reguladoras, células B reguladoras.



## 1. INTRODUCCIÓN

El virus *linfotrópico humano tipo 1* (HTLV-I) es un retrovirus que infecta cerca de 15 a 20 millones de personas a nivel mundial (Edlich *et al.*, 2003). En Colombia, la prevalencia es de 7,5 - 10%, siendo más frecuente en personas provenientes de la costa pacífica (Salcedo-Cifuentes *et al.*, 2011). La transmisión del virus puede ocurrir por transfusiones sanguíneas, contacto sexual, periodos de lactancia prolongados (transmisión vertical) y uso compartido de agujas (Proietti *et al.*, 2005). Después de la infección primaria, la persona infectada por el HTLV-I puede permanecer asintomática a lo largo de la vida, sin embargo aproximadamente el 10% de infectados desarrollan manifestaciones relacionadas con enfermedades de tipo inflamatorio (Verdonck *et al.*, 2007). La infección por HTLV-I se ha asociado principalmente con leucemia de células T del adulto (ATL) (Uchiyama *et al.*, 1977) y con Paraparesia Espástica Tropical (PET) o mielopatía asociada al virus *HTLV-I* (HAM) denominada PET/HAM (Gessain *et al.*, 1985).

La PET/HAM es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por paresias en miembros inferiores, alteraciones sensoriales y pérdida del control de esfínteres (Cartier, 2009b), lo que ocasiona problemas de movilidad que con el paso del tiempo inhabilitan la marcha causando cambios en el estilo de vida de los pacientes, trastornos psicológicos y cuadros depresivos (Solarte *et al.*, 2011). El riesgo de la progresión a PET/HAM entre persona infectadas a nivel mundial, es de 1,5 - 3% (Arisawa *et al.*, 2000); en cuanto a Colombia, este riesgo oscila entre 0,25 - 4% (Arango *et al.*, 1988). Se desconoce cuáles son las causas del desarrollo de la enfermedad entre los infectados, sin embargo, algunas evidencias sugieren que la sintomatología propia de la enfermedad se relaciona con irregularidades en la respuesta inmune del hospedero, lo que sería un factor determinante para la progresión de la enfermedad (Bangham *et al.*, 2015a).

En PET/HAM el daño severo a nivel del sistema nervioso central es caracterizado por inflamación localizada, mediada por una alta infiltración de células T, entre ellas el tipo TCD4<sup>+</sup>, blanco de infección del virus, y el tipo TCD8<sup>+</sup> citotóxico que está dirigido contra las células infectadas (Bangham *et al.*, 2015a). La estimulación constante debida a la presencia del virus promueve que un gran repertorio de células T se mantengan activas, lo que resulta en el proceso de agotamiento celular caracterizado por la expresión de CD57; de esta manera se debilita la respuesta efectora en cuanto a proliferación y citotoxicidad (Afeltra *et al.*, 1997; Lopez-Vergès *et al.*, 2010).

Adicionalmente, la citoquina Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), producida por las células T como parte de la respuesta inmune antiviral, se ha asociado a la exacerbación de la enfermedad (Bangham *et al.*, 2015a). Recientemente, se ha descrito que las células T reguladoras (Tregs) con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> representan el principal reservorio del HTLV-I. Estas células infectadas disminuyen la expresión de FOXP3 (reconocido por ser el marcador universal de las células T reguladoras) y se transforman en células productoras de IFN- $\gamma$ , característica fisiopatológica de la PET/HAM (Yamano *et al.*, 2009). En contraste, citoquinas de tipo anti-inflamatorio como la IL-4 se presentan en bajos niveles, afectando el proceso de la regulación de la respuesta inflamatoria (Montanheiro *et al.*, 2009).

Las manifestaciones aberrantes del sistema inmunológico destacan problemas en los procesos regulatorios en pacientes con PET/HAM, donde se evidencia una baja frecuencia de células con fenotipo  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ , lo que promueve un microambiente pro-inflamatorio (Yamano *et al.*, 2005). No obstante, poco se conoce sobre el papel de otros mecanismos de regulación del sistema inmune en pacientes con PET/HAM, por ejemplo, no ha sido reportada la acción de células  $CD4^+CD25^{hi}CD73^+$  (supresión metabólica) (Antonioli *et al.*, 2013), y de las células  $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$  (promueven el estado de Treg inducible); mecanismos que podrían tener injerencia en el deterioro inmunológico del hospedero y la velocidad de desarrollo de la PET/HAM. Así mismo, en los últimos años se ha descrito una subpoblación de células B con fenotipo  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  con función reguladora (Blair *et al.*, 2010; Flores-Borja *et al.*, 2013), estas células son importantes en la prevención del desarrollo de enfermedades autoinmunes (Blair *et al.*, 2010; Flores-Borja *et al.*, 2013), sin embargo, en PET/HAM a pesar de existir disfunción en los procesos de regulación, esta subpoblación celular todavía no ha sido estudiada.

Debido a la poca descripción de los fenómenos relacionados con el mecanismo de las células T y B reguladoras en relación con PET/HAM, este proyecto evaluó la frecuencia de células reguladoras circulantes y la capacidad de células  $TCD4^+$  y  $TCD8^+$  de producir citoquinas y la relación con el grado de activación y senescencia en pacientes con PET/HAM, comparado con individuos sanos, con el fin de aportar al entendimiento de la inmunopatología de la enfermedad.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La PET/HAM es una patología difícil de diagnosticar en su fase temprana, usualmente no se sospecha de ella debido a su poca frecuencia, o por desconocimiento por parte del personal médico (Solarte *et al.*, 2011). La PET/HAM es más prevalente en mujeres que en hombres (Bangham *et al.*, 2015a) y la mayoría de pacientes son diagnosticados en edades avanzadas (después de los 50 años), donde además el paciente puede presentar otras patologías independientes que empeoran el curso de la enfermedad (Murphy *et al.*, 1991; de Castro Costa *et al.*, 1997). Además, la posibilidad del tratamiento es limitada ya que se rige únicamente al manejo sintomático (Solarte *et al.*, 2011).

Debido a que el desarrollo de la enfermedad se debe a desordenes inflamatorios, se sugiere que existen deficiencias en los mecanismos de regulación por parte del sistema inmunológico mediado principalmente por las células T y B reguladoras (Kleinewietfeld and Hafler, 2014), sin embargo, son pocos los estudios dedicados a la descripción de estas funciones. Los resultados presentados en este trabajo de investigación describen los fenómenos regulatorios relacionados con la PET/HAM en comparación con individuos sanos, evaluando el porcentaje de linajes celulares como: células Treg  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ ,  $CD4^+CD25^{hi}CD73^+$ ;  $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$  y células Breg  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ . Adicionalmente, se evaluó la relación entre las células productoras de  $IFN-\gamma$  e IL-4, para entender del comportamiento de la inflamación en pacientes con PET/HAM. Simultáneo a esto, se determinó el estado de activación de los linfocitos,



mediante la cuantificación del marcador HLADR, y el estado de agotamiento celular, mediante la cuantificación del marcador CD57.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo contribuye al conocimiento sobre los procesos regulatorios que son afectados durante el desarrollo de PET/HAM y da a conocer cómo los linajes celulares evaluados y sus productos, se asocian con el proceso inflamatorio de la enfermedad, indicando una relación directa o indirecta en su fisiopatología. Además, cabe resaltar que esta investigación es la primera en describir el papel de las células B reguladoras, y los linajes de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD73<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>DPI<sup>+</sup> en la PET/HAM a nivel mundial. Finalmente, éste trabajo aporta al fortalecimiento de la línea de investigación en virología del Grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias de la Salud y en la formación de profesionales con un perfil investigativo.

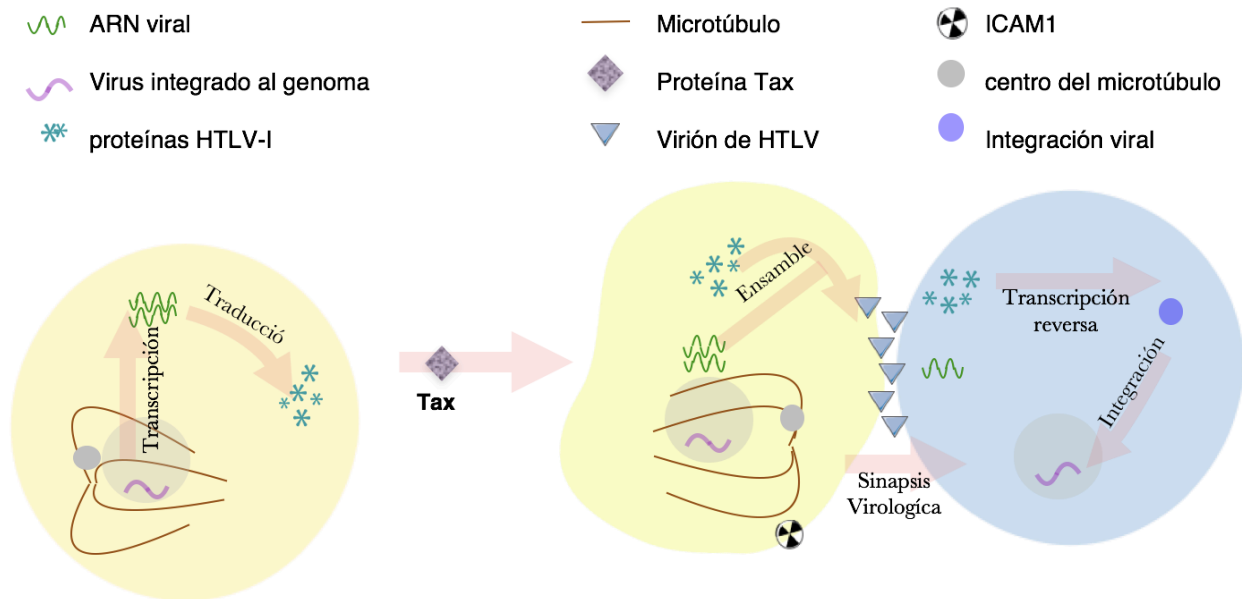
### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. VIRUS DEL HTLV-I

El virus *linfotrópico humano de células T tipo 1* (HTLV-I) fue identificado por primera vez en el año 1980 en un paciente portador de linfoma de células T (Poiesz *et al.*, 1980). Este virus pertenece al género *Deltaretrovirus*, subfamilia *Oncoviridae*, familia *Retroviridae* (Cartier, 2009a; Mendoza-Suárez, 2011). El HTLV-I es un virus con envoltura, cuyo genoma consiste en dos cadenas positivas de ARN las cuales contienen genes reguladores y no reguladores como *gap*, *pro*, *pol*, y *env*, estos son flanqueados por dos regiones terminales repetidas (LTR), como la región pX localizada entre el gen *eve* y la región 3'LTR (Carpentier *et al.*, 2015). Según el modelo actual, se cree que las proteínas Tax y HBZ tienen el mayor impacto en la replicación viral y la transformación celular, además de otros componentes necesarios para sintetizar la partícula viral. Tax inhibe los supresores de tumores p53, Bcl11B y TP53INP1 (Reid *et al.*, 1993; Yeung *et al.*, 2008; Takachi *et al.*, 2015), y activa las quinasas dependientes de ciclina (Boxus *et al.*, 2008), estos mecanismos conducen a la proliferación celular acelerada. Por otro lado, HBZ es menos inmunogénica, lo que permite que su expresión sea permanente a lo largo de la infección por HTLV-I (MacNamara *et al.*, 2010). HBZ contrarresta la modulación de las vías víricas y celulares mediadas por la Tax y estimula la proliferación celular mediante la inhibición del ciclo celular y la apoptosis (Satou *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2008). Se asume que la proteína Tax inicia la transformación celular, mientras que HBZ mantiene el fenotipo transformado a lo largo del tiempo (Andrade *et al.*, 2013).

El blanco principal del HTLV-I son las células TCD4<sup>+</sup>, no obstante, también infecta otros tipos celulares como los linfocitos B y TCD8, células dendríticas, monocitos y macrófagos (Koyanagi *et al.*, 1993; Carpentier *et al.*, 2015). Este patrón pleiotrópico es permitido por la presencia de receptores asociados a la membrana que incluyen proteoglicanos de heparan sulfato (Jones *et al.*, 2005); el transportador de glucosa 1 (Manel *et al.*, 2003); y neuropilin-1 (Ghez *et al.*, 2006), que interactúan con la envoltura viral permitiendo una unión y entrada eficiente (Fuzii *et al.*, 2014). Una vez establecida la infección dentro de la célula, el HTLV-I se integra al genoma del hospedero y sus genes se transcriben y

traducen a diferentes proteínas estructurales y funcionales, lo que permite la generación de nuevos viriones que irán a infectar nuevas células (Igakura *et al.*, 2003; Nejmeddine *et al.*, 2009; Bangham *et al.*, 2015a) (Figura 1).



**Figura 1. Infección por el virus HTLV-I.** Los microtúbulos transportan las proteínas virales y el genoma del virus hacia la sinapsis celular (contacto célula – célula) donde los viriones son ensamblados y trasladados hacia la célula no infectada a través de la membrana plasmática, cruzando el espacio intercelular (Igakura *et al.*, 2003; Majorovits *et al.*, 2008) (Pais-Correia *et al.*, 2010). El contacto célula-célula activa un camino de señalización sinérgica en el cual la molécula ICAM 1 estimula la reorganización de los microtúbulos polarizándolos en dirección a la zona de contacto, mientras la proteína viral TAX contribuye al establecimiento de la sinapsis virológica, fusionándose con la membrana de la célula diana e incrementando su contenido al interior del citoplasma. El genoma RNA es transcrito por la transcriptasa reversa a DNA complementario, el cual se asocia con la enzima viral integrasa para formar un complejo pre-integración; este complejo permite el acceso al genoma del hospedero cuando la envoltura nuclear se desensambla durante la mitosis, y una copia individual del virus es integrada en el genoma hospedero (Maertens *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2012; Bangham *et al.*, 2014; Bangham *et al.*, 2015a). Figura modificada de Bangham *et al.* (2015a).

Después de establecida la infección por HTLV-I en el individuo, esta puede propagarse a través de la transmisión por contacto sexual, periodos de lactancia prolongados (transmisión vertical de madre infectada a hijo), transfusiones sanguíneas y uso compartido de agujas (Verdonck *et al.*, 2007). En todos los casos de transmisión, salvo transfusiones sanguíneas, la infección inicial requiere cruzar la barrera mucosa por diferentes mecanismos, entre los que se han descrito: (i) transmigración de macrófagos infectados con HTLV-I; (ii) transcitosis de partículas virales; (iii) liberación de nuevos viriones producidos por células epiteliales basales infectadas; y (iv) paso de células infectadas con HTLV-I a través de una mucosa erosionada (Cook *et al.*, 2012).

El HTLV-I puede infectar directamente las células inmunitarias de la mucosa, vía células presentadoras de antígeno, quienes a su vez infectan las células T a través de la transferencia de viriones mediante contacto célula-célula. La infección de las células puede ocurrir tanto en la mucosa, como en los órganos linfoides secundarios, sitios en los que el virus puede permanecer de manera latente por muchos años (Carpentier *et al.*, 2015). Sin embargo, el virus puede sufrir procesos de activación (mecanismo

desconocido), teniendo como consecuencia el desarrollo de patologías como: Leucemia de células T del adulto (LTA) (Uchiyama *et al.*, 1977), Paraparesia espástica tropical, Uveitis (Mochizuki *et al.*, 1992), Síndrome de Sjögren (Eguchi *et al.*, 1992), Broncoalveolitis, Artritis (Nishioka *et al.*, 1989) y Poliomiocitis (Morgan *et al.*, 1989). En todas las patologías mencionadas se ha registrado una alta concentración de células T infectadas por el virus en el tejido afectado (Araya *et al.*, 2011).

### 3.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR HTLV-I

La infección primaria por el HTLV-I puede permanecer asintomática a lo largo de la vida, sin embargo algunas personas infectadas (aproximadamente el 10%) desarrollan manifestaciones relacionadas con enfermedades de tipo inflamatorio (Verdonck *et al.*, 2007). En la actualidad no existen datos de la incidencia de la infección por HTLV-I a nivel mundial, sin embargo algunos autores han intentado estimar su prevalencia. Estos estudios han encontrado estimativos entre 10 - 20 y 5 a 10 millones de personas infectadas en todo el mundo; no obstante estos autores resaltan que los datos obtenidos son de regiones endémicas para el virus, omitiendo cerca del 80% de la población mundial (Hlela *et al.*, 2009).

En regiones endémicas, los rangos de prevalencia en la población van desde menos de 1 hasta más de 1.000 por cada 10.000 habitantes. Los lugares de más alta prevalencia a nivel mundial son Japón, Sur América, la cuenca del Caribe, Australia central y África occidental, central y meridional. Los países con mayor prevalencia son Japón y Brasil, que registran más de un millón de personas infectadas (Gessain and Cassar, 2012; Bangham *et al.*, 2015a). Los datos de prevalencia pueden ser analizados dependiendo de ciertas características poblacionales; por ejemplo, la prevalencia en niños aumenta hasta los 2 años de edad y permanece estable hasta la pubertad; en adultos, la prevalencia incrementa constantemente con la edad y es mayor en mujeres que en los hombres e incrementa después de los 50 años (Murphy *et al.*, 1991; Ando *et al.*, 2003).

En Colombia la distribución del virus varía considerablemente de una zona geográfica a otra, afectando a personas de todas las razas y condiciones sociales. La prevalencia es mayor en la zona costera del pacífico y se estima entre 7,5 - 10% (Salcedo-Cifuentes *et al.*, 2011). En un estudio realizado en 75 pacientes de la población Afro-Colombiana de la costa de Tumaco se reportó 5,1% de serología positiva para el virus de HTLV-I (Carrascal *et al.*, 2004); mientras que en Bogotá un estudio realizado con 8.913 donantes de sangre registró una seroprevalencia de 0,77% (Martínez-Nieto *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2013). El riesgo desarrollar la progresión de PET/HAM de un estado asintomático a uno sintomático es de 0,25% a 3,8% (Yamano and Sato, 2012). En el Cauca, la prevalencia es desconocida.

### **3.3. PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL ASOCIADA AL VIRUS DE HTLV-I (PET/HAM)**

La PET/HAM es una mielopatía progresiva crónica caracterizada por parálisis espástica, disfunción de esfínteres y alteraciones sensoriales en las extremidades inferiores que pueden ser de leves a severas (Vallejo, 2006). En Colombia, la PET/HAM tiene una alta prevalencia en áreas donde la infección por el virus HTLV-I es endémico, por ejemplo, la costa del pacífico (Osame *et al.*, 1986; Román, 1988).

El riesgo de desarrollar PET/HAM a nivel mundial es heterogéneo, por ejemplo, en poblaciones japonesas, se ha reportado que el 0,25% de individuos infectados por el HTLV-I desarrollan la enfermedad (Kaplan *et al.*, 1990; Blas *et al.*, 2003); mientras que, en personas descendientes de Afro-Caribes, el riesgo de desarrollar PET/HAM es del 2,4% según un estudio realizado en donadores de sangre en los Estados Unidos de Norteamérica, donde además se indicó que después de 10 años, este riesgo aumenta a 3,7% (Murphy *et al.*, 1997; Orland *et al.*, 2003). En Trinidad y Tobago el riesgo es de 1,9% (Orland *et al.*, 2003). En un estudio de cohorte en Brasil, la incidencia de PET/HAM fue 5,3 casos por 1.000 personas al año (Romanelli *et al.*, 2013) y en Chile se estima que 2 personas de cada 1.000 infectadas desarrollan PET/HAM (Vasquez *et al.*, 1991) (Cartier, 2009b).

Se conoce que la edad, el género y la vía de adquisición del HTLV-I influyen en el riesgo de desarrollar PET/HAM, por ejemplo, su desarrollo es raro en niños y tiene una incidencia máxima en la quinta década de vida (Maloney *et al.*, 1998). En relación al género, la proporción entre mujeres y hombres es variada, por ejemplo, en Trinidad y Tobago es de 3:1 (Maloney *et al.*, 1998) y en descendientes de Afro-caribes que viven en el Reino Unido es de 4:1 (Martin *et al.*, 2010). De manera relacionada, en un estudio de 88 pacientes con PET/HAM de Brasil, la enfermedad progresó más rápido en mujeres que en hombres (Lima *et al.*, 2007). El mayor riesgo de desarrollar PET/HAM en mujeres se debe en parte a una mayor frecuencia de infección, sin embargo, no se conocen de manera específica los mecanismos por los cuales son más susceptibles (Bangham *et al.*, 2015b)

Por último, se han reportado casos de PET/HAM que se desarrollaron meses después de la infección por HTLV-I adquirida mediante transfusión de sangre o mediante trasplante de órganos sólidos o de médula ósea (Kaplan *et al.*, 1991; Toro *et al.*, 2003). El desarrollo de PET/HAM se da después de varios años de contraer la infección, por lo que es difícil predecir o cuantificar el riesgo de desarrollar la enfermedad (Mendoza-Suárez, 2011).

### **3.4. FACTORES DE PREDISPOSICIÓN A PET/HAM**

#### **3.4.1. Carga proviral**

La carga proviral de HTLV-I es el predictor más fuerte del desarrollo de PET/HAM, aunque rara vez se diagnostique a través de éste método a portadores con carga menor al 1%. En portadores con carga mayor, se ha relacionado un aumento exponencial de la

prevalencia de PET/HAM (Nagai *et al.*, 1998; Jeffery *et al.*, 1999; Vine *et al.*, 2002), sin embargo, una alta carga viral, no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad (Taylor *et al.*, 1999; Olindo *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2010). La carga viral se mide como el número de copias de ADN de HTLV-I por células mononucleares de sangre periférica (PBMC del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells) y se expresa normalmente como el porcentaje de PBMC infectadas, suponiendo que cada célula lleva una única copia proviral (Cook *et al.*, 2012). Después de la fase aguda de la infección, la carga proviral alcanza un valor estable o "punto de referencia", que es característico de la respuesta inmunológica de cada individuo (Bangham, 2009), la que a su vez está determinada por el genotipo del huésped (Bangham *et al.*, 2015a).

### 3.4.2. Genética del huésped

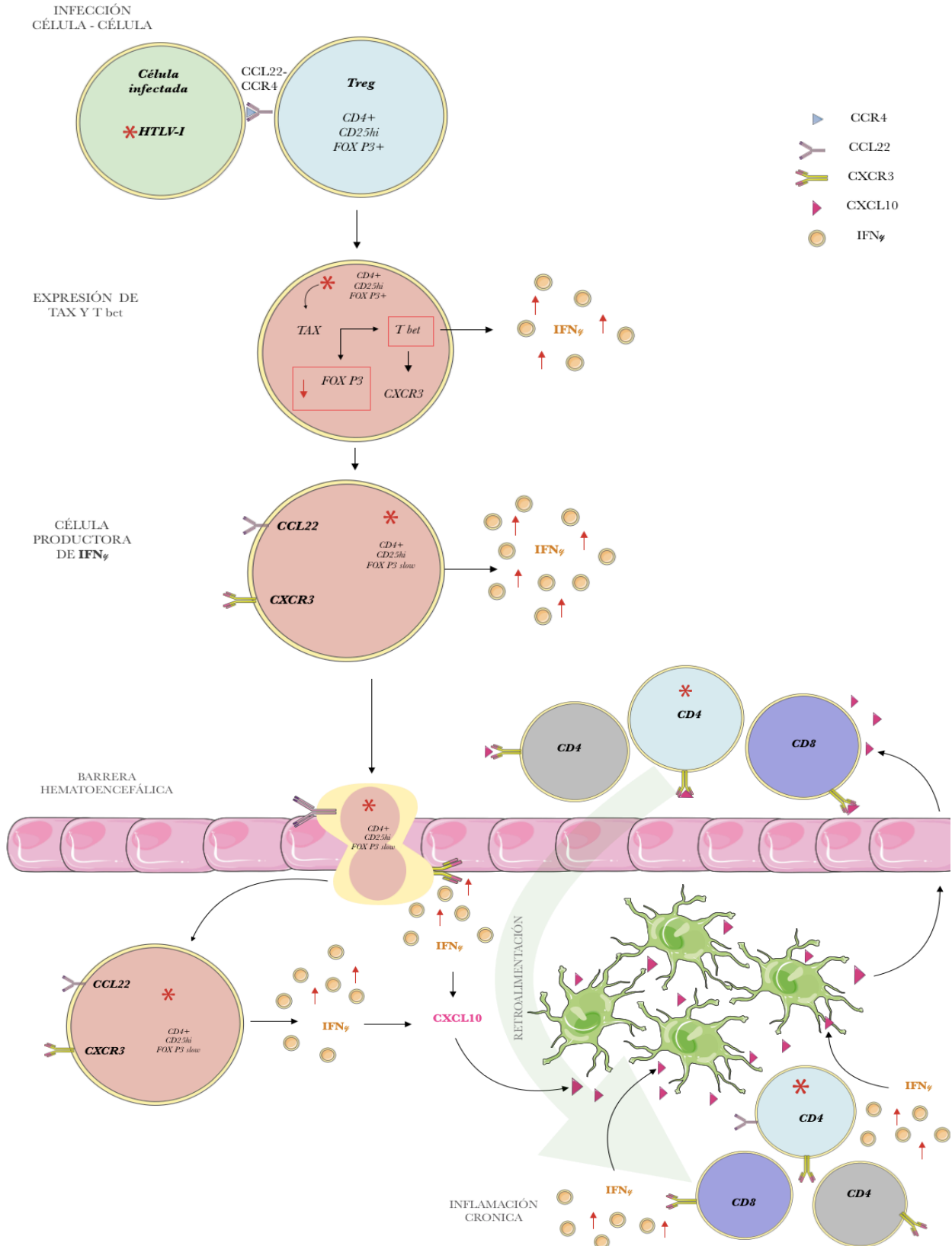
La infección con HTLV-I es un requisito previo para el desarrollo y diagnóstico de PET/HAM. Debido a que la enfermedad aparece en diferentes edades entre las personas infectadas, se sugiere que factores ambientales o propios del huésped determinan el riesgo de padecerla (Bangham *et al.*, 2015a). Por ejemplo, el genotipo HLA de clase I de un individuo determina la especificidad y eficacia de la respuesta de células TCD8<sup>+</sup> contra un virus, y a su vez, la respuesta de las células TCD8<sup>+</sup> determina la carga proviral, y por lo tanto, el riesgo del individuo a desarrollar una enfermedad asociada con HTLV-I. En estudios donde se analizaron las secuencias de la molécula HLA en pacientes infectados con HTLV-I, se encontró que la expresión del alelo de clase 1 HLA-A\*02 ejerció un efecto protector en cohortes del sur de Japón, Afro-Caribes del Reino Unido y en una cohorte Brasileña (Jeffery *et al.*, 1999; Jeffery *et al.*, 2000; Catalan-Soares *et al.*, 2009; Bangham *et al.*, 2014). Sin embargo, HLA-A\*02 no mostró ser protector en cohortes estudiadas en Perú, Irán y las Antillas francesas (Deschamps *et al.*, 2010). En un estudio realizado en España, HLA-DRB1\*0101 y HLA-B\*07 se asociaron con mayores cargas provirales y con el desarrollo de PET/HAM (Treviño *et al.*, 2013). Se debe resaltar que la comparación entre estudios de variabilidad genética intrapoblacionales que tienen un *n* de muestra pequeño impiden llegar a conclusiones definitivas sobre la importancia de la molécula de HLA como indicador de predisposición o protección para el desarrollo de PET/HAM (MacNamara *et al.*, 2010).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) también se han asociado con el desarrollo de PET/HAM. Por ejemplo, el polimorfismo en el sitio 634 del promotor del gen para IL6 y el polimorfismo en el sitio 963A del promotor del gen para TNF, se relacionan con la exacerbación de la respuesta inflamatoria (Gadelha *et al.*, 2008), mientras que el polimorfismo en la región promotora 592 del gen IL10, promueve una baja producción de esta citoquina inmunosupresora (Sabouri *et al.*, 2004); además el polimorfismo de la región 3'UTR de la quimiocina estromal se asocia con la reducción del 50% en el riesgo de desarrollar PET/HAM (Vine *et al.*, 2002).

### 3.5. FISIOPATOLOGÍA

El sistema inmunológico juega un papel elemental en el desarrollo de la PET/HAM. La eficiencia de la respuesta inmunológica influye en la carga proviral y consecuentemente en el riesgo de que una persona infectada con el virus desarrolle la enfermedad (Ureta-Vidal *et al.*, 2001; Bangham *et al.*, 2015a). La fisiopatología de la PET/HAM está encaminada por una serie de procesos que parten del contacto célula-célula, donde el virus infecta la célula T reguladora (Treg) con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Este suceso se atribuye a la afinidad entre el receptor de membrana CCR4, conocido por expresarse selectivamente en las células Treg y Th2 (Yamano *et al.*, 2009; Araya *et al.*, 2014; Yamano and Coler-Reilly, 2017); y la quimiocina CCL22, encontrada en altas cantidades en los pacientes con PET/HAM (Toulza *et al.*, 2010). Una vez la célula Treg es infectada, se activa la proteína viral Tax cuya función se relaciona con la modulación de proteínas y quimiocinas, esta inhibe la expresión de FOXP3 y estimula la expresión de Tbet, la cual promueve la expresión de IFN- $\gamma$  y del receptor de membrana CXCR3. A partir de esto, la célula adquiere un comportamiento tipo Th1, convirtiéndose en una célula productora de IFN- $\gamma$  (Fuzii *et al.*, 2014).

La célula productora de IFN- $\gamma$ , atraviesa la barrera hematoencefálica e ingresa al tejido del Sistema Nervioso Central (SNC), en donde la producción de IFN- $\gamma$  estimula la expresión de la quimiocina CXCL10 en monocitos, células endoteliales, fibroblastos y particularmente en astrocitos (Shin *et al.*, 2009; Ando *et al.*, 2013), obteniendo como resultado, el reclutamiento de nuevas células al interior del SNC mediante la interacción con el receptor de membrana CXCR3. De esta manera, la infiltración inflamatoria del SNC se encuentra principalmente representada por células TCD4<sup>+</sup> con carga viral relativamente alta, elevado porcentaje de TAX, y alta producción de IFN- $\gamma$ ; seguida de células TCD8<sup>+</sup> encargadas de eliminar las células infectadas. Finalmente, ambos tipos celulares entran a un ciclo de retroalimentación donde hay una producción excesiva de IFN- $\gamma$  que lleva a inflamación crónica y daño tisular (Umehara *et al.*, 1994; Moritoyo *et al.*, 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación del mecanismo mediante el cual se genera la lesión del tejido nervioso en la PET/HAM. Modificado de **Bangham (2015a)**.

### **3.6. PAPEL DE LAS CÉLULAS T EN EL DESARROLLO DE PET/HAM**

#### **3.6.1. Linfocitos TCD4<sup>+</sup>**

La respuesta de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> en pacientes con PET/HAM no ha sido estudiada en detalle, sin embargo hay estudios que demuestran que estas células predominan en las lesiones tempranas de esta patología (Goon *et al.*, 2002). La respuesta de las células TCD4 es importante debido a que: 1) las células TCD4<sup>+</sup> son el principal reservorio del virus HTLV-I (Hanon *et al.*, 2000); 2) las células TCD4<sup>+</sup> infectadas por el virus secretan espontáneamente citoquinas pro-inflamatorias y neurotóxicas como el IFN- $\gamma$  y el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que se encuentran elevados en el Líquido Ceforraquídeo (LCR) y en las lesiones de la médula espinal en pacientes con PET/HAM (Uchiyama *et al.*, 1977; Hanon *et al.*, 2001); 3) las células TCD4<sup>+</sup> infectadas por HTLV-I pueden alterar la función de las células Th, convirtiéndolas en células T inducibles y así aumentar la proliferación de células Th1 (Bangham *et al.*, 2015a); 4) las células TCD4<sup>+</sup> son el subconjunto predominante de linfocitos infectados encontrados en las lesiones del SNC de pacientes con PET/HAM en la fase temprana de la enfermedad (Iwasaki, 1993), lo que sugiere que estas células juegan un papel muy importante en su patogénesis (Hanon *et al.*, 2001).

#### **3.6.2. Linfocitos TCD8<sup>+</sup>**

Los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> cumplen un papel central en la defensa inmunitaria contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos; su función se realiza a través de dos mecanismos: citotoxicidad y liberación de citoquinas. Para lograr la función citotóxica, las células TCD8<sup>+</sup> emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como la perforina, que forma poros que permiten el paso de otras moléculas como la granzima B que activa la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas (Trapani and Smyth, 2002). Respecto a la liberación de citoquinas, las células TCD8<sup>+</sup> participan en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en la respuesta antiviral (Woodland and Dutton, 2003). Las células TCD8<sup>+</sup> son abundantes en la sangre periférica de pacientes con PET/HAM, esto se debe a la carga proviral del HTLV-I que promueve la activación persistente de las células TCD8<sup>+</sup>, lo que causa daño tisular por la segregación de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Jacobson, 2002; Oh and Jacobson, 2008; Bangham *et al.*, 2015a). La expresión de la proteína Tax en la superficie de las células TCD4<sup>+</sup> provoca la activación de las TCD8<sup>+</sup>, que contribuyen a destruir las células infectadas por el HTLV-I y perpetúan el proceso inflamatorio (Carod-Artal, 2009).

### **3.7. PAPEL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs) EN EL DESARROLLO DE PET/HAM**

Las células Treg son el elemento central para el mantenimiento de la tolerancia periférica. Se ha demostrado que las Tregs desempeñan un papel crucial durante la autoinmunidad



(Kleinewietfeld and Hafler, 2014), sin embargo, éstas pueden afectar la respuesta efectiva contra ciertos patógenos y células cancerígenas, cuando se ve afectada su función regulatoria, y por ende podrían ser perjudiciales para el huésped (Chaudhry and Rudensky, 2013). Existen varios subtipos de células Treg y la mayoría pertenecen al linaje celular TCD4<sup>+</sup> (Thompson and Powrie, 2004), entre ellas se encuentran las células T reguladoras naturales (nTreg) con fenotipo TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, las cuales tienen una frecuencia del 1-10% en el total de células TCD4<sup>+</sup> (Siachoque *et al.*, 2011). Las nTreg se caracterizan por expresar de manera exclusiva la proteína FOXP3, este factor de transcripción ha sido ampliamente utilizado y se reconoce como el marcador por excelencia de este linaje celular. En PET/HAM los linfocitos TCD4<sup>+</sup> que expresan FOXP3 son el principal reservorio del virus. Una vez infectados, la expresión de FOXP3 se ve disminuida, y los niveles de la proteína vírica Tax y la carga viral aumentan significativamente; esto confirma la importancia de las células TCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en la fisiopatología de la enfermedad.

La disminución o pérdida de la expresión de FOXP3 puede interrumpir la supresión natural de las Tregs, por lo cual, incluso estando diferenciadas pueden transformarse en células inflamatorias (Bosma *et al.*, 2012). Existen varios reportes donde las células Tregs sufren procesos de plasticidad celular, este fenómeno se debe a su capacidad de reprogramarse a células pro-inflamatorias productoras de citoquinas como IL6, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Arisawa *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2012). Este hecho puede ser atribuido a la interacción con el microambiente tisular local, ya que diversos procesos moleculares pueden afectar la plasticidad encaminándola a desarrollar diversas funciones, por lo cual la supresión natural de células Tregs está limitada por la protección y respuesta pro-inflamatoria (Gao *et al.*, 2012).

En PET/HAM el proceso de plasticidad celular, lleva a las células nTreg hacia un fenotipo tipo Th1 (productora de IFN- $\gamma$ ) (Mizoguchi *et al.*, 2002) por lo que se les denomina células tipo Th1-*like*, que predominan en el sistema nervioso central y en lesiones de la médula espinal de pacientes con PET/HAM (Araya *et al.*, 2014). También es importante resaltar que las células nTreg expresan otros marcadores asociados a su función reguladora, por ejemplo la expresión de CD73 con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD73<sup>+</sup>, cuya función es la metabolización de nucleótidos y la regulación de la inmunidad tardía e inflamación (Antonioli *et al.*, 2013). Otro marcador importante en el proceso de regulación es la proteína DPI (del inglés *Programmed cell death protein 1*), cuya función es diferenciar las células T *naïve* a células Treg inducibles (Zhang *et al.*, 2016).

Otro subtipo regulador son las Treg inducibles, con fenotipo TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, que se caracterizan por expresar altos niveles de CD25 (Siachoque *et al.*, 2011). La función de las Tregs inducibles es controlar, la función de las células T efectoras activadas en las enfermedades autoinmunes mediante la secreción de las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$  (Siachoque *et al.*, 2011).

### 3.8. PAPEL DE LAS CÉLULAS B REGULADORAS (Bregs)

Las células B reguladoras (Breg) son células inmunosupresoras que soportan la tolerancia inmunológica y a su vez han sido asociadas con la inhibición de la inflamación excesiva (Mauri and Bosma, 2012), a través de la producción de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  (Shen *et al.*, 2014). Se cree que la interacción entre las células Breg y las T *naïve* controlan la inducción y el funcionamiento de las células Treg, dado que las células B deficientes del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (Yoshizaki *et al.*, 2012) y de la proteína B7, afectan el proceso de diferenciación de las células Tregs inducibles por la disminución de la producción de IL-10 (Mann *et al.*, 2007). Por otro lado, las células Breg suprimen la diferenciación de las células Th1 y Th17 evitando así la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Sun *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2014). También se ha dicho que las células Breg apoyan el mantenimiento de la homeóstasis de las células Natural Killer de cadena invariante (Bosma *et al.*, 2012).

Hasta ahora se han descrito múltiples subconjuntos de células Breg con muchas similitudes en las funciones efectoras. Sin embargo, todavía no se ha aclarado si las diferencias observadas se deben a la existencia de distintos linajes celulares de células Breg o a cambios dependientes del entorno inmunológico (Tebbe *et al.*, 2016). Existen estudios en los que se ha demostrado que las células B inmaduras, maduras y plasmáticas tienen la capacidad de diferenciarse en células B reguladoras productoras de IL-10 (Rosser and Mauri, 2015). Al igual que las células Treg, existen varios marcadores para la identificación de Breg; en humanos, se han identificado los fenotipos CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD71<sup>hi</sup> en sangre y en sitios de inflamación (Rosser and Mauri, 2015). Estos fenotipos celulares producen IL-10, inducen la diferenciación a células Treg, suprimen la proliferación de las células Th1 y Th17 y la respuesta de las células TCD8<sup>+</sup> antígeno específicas (Blair *et al.*, 2010; Flores-Borja *et al.*, 2013; van de Veen *et al.*, 2013; Matsumoto *et al.*, 2014). Como se puede observar la IL-10 ha sido útil en la definición de poblaciones de células B reguladoras, pero aún no se ha identificado un marcador específico para este linaje.

Existe una fuerte evidencia que el número y la capacidad de supresión de las células Breg aumentan en respuesta a la inflamación (Mizoguchi *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2007), sin embargo no hay un consenso sobre su origen. En la actualidad se han descrito dos modelos para tratar de explicar el principio de esta subpoblación celular. El primero señala que las células Breg, al igual que las nTreg, presentan un factor de transcripción específico que controla la expresión de genes responsables de su naturaleza supresora. El segundo, sugiere que en respuesta a ciertos estímulos, las células B adoptan un fenotipo regulador para suprimir la inflamación local (van de Veen *et al.*, 2013). A pesar del esfuerzo considerable, ningún estudio en los que se hayan analizado arreglos de genes en células Breg humanas ha identificado de forma concluyente un marcador específico de linaje equivalente al FOXP3 de las células Treg (van de Veen *et al.*, 2013; Rosser and Mauri, 2015).

Entre los fenotipos más estudiados de células Bregs, se ha demostrado que el CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> inhibe la diferenciación de células Th1 mediante la liberación de IL-10. Otros estudios han demostrado que esta población de células Breg, en pacientes con enfermedades autoinmunes, se encuentra en una menor proporción, lo que disminuye su capacidad reguladora y contribuye a empeorar la patología; razón por la cual es importante el estudio de esta población ya que podría tener los mismos efectos en la PET/HAM (Blair *et al.*, 2010).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la frecuencia de células T y B reguladoras circulantes y funciones efectoras de los linfocitos T en individuos con paraparesia espástica tropical (PET/HAM) e individuos sanos.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar el porcentaje de células T y B reguladoras en pacientes diagnosticados con PET/HAM e individuos sanos.
- Estimar la producción intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-4 en linfocitos TCD4 y TCD8 en pacientes diagnosticados con PET/HAM e individuos sanos.
- Cuantificar la activación y senescencia de células TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> en pacientes diagnosticados con PET/HAM e individuos sanos.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

La población de estudio fue seleccionada a partir de criterios de inclusión y exclusión mencionados a continuación

#### **5.1.1. Criterios de inclusión**

Las personas participantes del proyecto en calidad de pacientes fueron mayores de 18 años de edad, diagnosticados con PET/HAM y con una serología positiva para HTLV-I.

Los controles fueron mayores de edad con una serología negativa para HTLV-I y que no padecían enfermedades al momento del ingreso al estudio. Para la realización del proyecto únicamente se tuvieron en cuenta personas que firmaron el consentimiento informado, que completaron el cuestionario y accedieron a la toma de muestra de sangre.

Los pacientes diagnosticados con PET/HAM fueron incluidos en el estudio independientemente del tratamiento que estuvieran recibiendo en ese momento.

#### 5.1.2. Criterios de exclusión

El proyecto no admitió personas menores de 18 años de edad, pacientes VIH positivos, o personas con otras afecciones agudas o crónicas; tampoco fueron incluidos pacientes con Paraparesia Espástica Tropical y serología negativa para HTLV-I, participantes que no firmaron el consentimiento informado y no autorizaron el acceso a las muestras requeridas en la investigación.

Se estudiaron 19 pacientes provenientes del servicio de neurología del Hospital Universitario San José de Popayán, los cuales presentaban sintomatología neurológica consistente en alteraciones en la marcha, parestesias, alteraciones en la sensibilidad, sensación de debilidad muscular, incontinencia urinaria, además de hiperreflexia en miembros inferiores, hiper/hipotonía muscular y signo de Babinski positivo (Pías-Peleiteiro *et al.*, 2015). La confirmación de PET/HAM se determinó por seropositividad para el HTLV-I mediante las técnicas de ELISA y Western-blot. Los pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión fueron 9, los cuales fueron apareados con 9 controles sanos, de acuerdo a los criterios de edad y género.

El tamaño de la muestra se seleccionó por conveniencia y certeza del padecimiento de la enfermedad. Las personas incluidas en el proyecto fueron entrevistadas. Simultáneo a esto, se les realizó una explicación detallada de los objetivos y metodología. Posteriormente, se analizó el cumplimiento con los criterios de inclusión y exclusión. Cuando la persona acepto voluntariamente participar en el estudio, se le solicitó la firma de consentimiento informado, se llenó una encuesta que competía información básica relacionada con la enfermedad incluyendo edad, sexo, tiempo de diagnóstico y tratamiento (anexo 1).

#### 5.1.1. Criterios de inclusión

Las personas participantes del proyecto en calidad de pacientes fueron mayores de 18 años de edad, diagnosticados con PET/HAM y con una serología positiva para HTLV-I.

Los controles fueron mayores de edad con una serología negativa para HTLV-I y que no padecían enfermedades al momento del ingreso al estudio. Para la realización del proyecto únicamente se tuvieron en cuenta personas que firmaron el consentimiento informado, que completaron el cuestionario y accedieron a la toma de muestra de sangre. Los pacientes diagnosticados con PET/HAM fueron incluidos en el estudio independientemente del tratamiento que estuvieran recibiendo en ese momento.

### 5.1.2. Criterios de exclusión

El proyecto no admitió personas menores de 18 años de edad, pacientes VIH positivos, o personas con otras afecciones agudas o crónicas; tampoco fueron incluidos pacientes con Paraparesia Espástica Tropical y serología negativa para HTLV-I, participantes que no firmaron el consentimiento informado y no autorizaron el acceso a las muestras requeridas en la investigación.

## 5.2. PROCEDIMIENTOS

### 5.2.1. Toma de muestra de sangre venosa periférica

La toma de muestra de sangre periférica se realizó mediante punción venosa en el antebrazo siguiendo los protocolos de bioseguridad, este procedimiento fue realizado por parte de personal capacitado. A cada individuo se le tomo aproximadamente 15mL de sangre periférica en tubo con heparina.

### 5.2.2. Determinación de Infección por el virus HTLV-I

A partir del suero se realizó la prueba de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (DIA.PRO). Posteriormente, se confirmó el diagnóstico por la técnica de Western-blot, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad, Berkeley. CA).

### 5.2.3. Extracción de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (BioWhittaker). Se evaluó la viabilidad celular utilizando la dilución de 1:10 con azul de Tripán (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA), el número de células totales se determinó utilizando cámara de Neubauer aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células totales en los 4 cuadrantes} \times \text{factor de dilución} \times 10.000}{4}$$

### 5.2.4. Fenotipificación de las subpoblaciones de células Treg

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células mononucleares fueron depositadas en tubos de Citometría de flujo (Falcon, Becton Dickinson). Se realizó marcación extracelular con anticuerpos anti-CD4 (clon: OKT4), anti-CD25 (clon: BC96), anti-CD73 (clon: AD2) y anti-DP-I (clon: SPM178), todos de eBioscience de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 1.

Una vez adicionados los anticuerpos a los tubos correspondientes, se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y oscuridad; posterior a ello se realizó un lavado con 10 mL de PBS 1X (GIBCO™ Invitrogen Corporation) durante 5 minutos, utilizando la centrifuga a 201g, manteniendo la temperatura de 4°C. Terminado el lavado, los tubos se fijaron con paraformaldehido 2% (SIGMA ALDRICH) durante 15 minutos a 4°C y oscuridad.

Para la marcación intracelular se permeabilizaron las células con la solución permeabilizadora (Fixation/Permeabilization Buffers, ebioscience) dilución 1:9, durante 5 minutos, a 4°C. Posterior a ello se realizó un lavado con PBS 1X, se adicionó el anticuerpo anti-FOXP3 (clone: 259D Biolegend) y se incubó durante 1 hora y 30 minutos, a 4°C y oscuridad.

Finalmente, las células se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 201g durante 5 minutos a 4°C. Después las células fueron resuspendidas en 200uL de PBS 1X y cuantificadas en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

**Tabla 1.** Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de células Treg

TUBOS	CONDICIONES
Tubo 1	Células
Tubo 2	Células + CD4 FITC(5uL) + CD25 PECy5(5uL)
Tubo 3	Células +CD4 FITC(5uL) + CD25 PECy5 (5uL) +FOX P3 PE(4uL)
Tubo 4	CD4 FITC (5uL) + CD25 PECy5(5uL) +CD73 PE (3uL) +DPI APC (3uL)

#### 5.2.5. Fenotipificación de las subpoblaciones de células Breg

Alrededor de  $1 \times 10^6$  células mononucleares se depositaron en tubos de citometría de flujo (Falcon, Becton Dickinson), posterior a ello se adicionaron marcadores Anti-CD19 (beckman coulter), anti-CD24 (clone: ML5 BioLegend), anti-CD38 (clone: HIT2 BioLegend), según las condiciones descritas en la tabla 2. Una vez adicionados los anticuerpos al tubo correspondiente, se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. A continuación, se realizó un lavado con 1 ml PBS y se centrifugó a 201g durante 5 minutos a 4°C. Después las células se fijaron con paraformaldehido 2% durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, fueron lavadas con 1 ml de PBS y cuantificadas en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

**Tabla 2.** Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de células Breg

TUBOS	CONDICIONES
Tubo 1	Células
Tubo 2	CD19 PE (5uL) + CD38 PECy5 (3uL) + CD24 ALEXA FLUOR 647 (3uL)

### 5.2.6. Cuantificación de células T activadas y senescentes

Para evaluar el estado de activación y senescencia celular de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>, aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células mononucleares fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4 (clon: OKT4), anti-CD8 (clon: HIT2), anti-CD57 (clon: HNK-1) y anti-HLADR (clon: L243), todos de BioLegend, según las condiciones descritas en la tabla 3. Una vez adicionados los anticuerpos a los tubos correspondientes, se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y oscuridad; posterior a ello se realizó un lavado con 1ml de PBS y se centrifugó a 201g durante 5 minutos a 4°C. Terminado el lavado, los tubos se fijaron con paraformaldehido 2% durante 15 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas y cuantificadas en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

**Tabla 3.** Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de T activación

TUBOS	CONDICIONES
Tubo 1	Células
Tubo 2	CD4 FITC (5uL) + HLADR PE (5uL) + CD8 PECy5 (3uL)
Tubo 3	CD4 FITC (5uL) +CD57 PE (5uL) + CD8 PECy5 (3uL)

### 5.2.7. Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares

Se depositaron 1x10<sup>6</sup> células mononucleares a cada tubo de citometría de flujo (Falcon, Becton Dickinson), las células fueron estimuladas policlonalmente con 40ng/mL de Phorbol Myristate Acetate (PMA) más 1 µg/mL de ionomicina y 10µg/mL de Brefeldina durante 6h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al final del tiempo de incubación, las células se marcaron con los anticuerpos anti-CD4 (clon: RPA-T4) y anti-CD8 (clon: RPA-T8) de BioLegend en las condiciones descritas en la tabla 4, se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y oscuridad; luego las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehido 2%. Después, las células se permeabilizaron con solución Fixation/Permeabilization Buffer y fueron incubadas con anticuerpos anti-IFN-γ (clon 4S.B3) y anti-IL4 (clon: 8D4-8) de eBioscience, durante 1 hora y 30 minutos, a 4°C y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con 1 ml de PBS y cuantificadas en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

**Tabla 4.** Condiciones para la fenotipificación de las subpoblaciones de citoquinas

TUBOS	CONDICIONES
Tubo 1	Células
Tubo 2	Células + CD4 PECY5 (3uL)
Tubo 3	Células + CD8 PECY5 (3uL)

**Tubo 4**

Células + CD4 PE CY5 (3uL) + IFN- $\gamma$  FITC (3uL) + IL-4 PE (5uL)

**Tubo 5**

Células + CD8 PE CY5 (3uL) + IFN- $\gamma$  FITC (3uL) + IL-4 PE (5uL)

---

### 5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con un valor crítico menor de 0,05. El porcentaje de los linfocitos evaluados para cada parámetro entre pacientes y controles se comparó con la prueba de U de Mann-Whitney. Los datos se consideraron significantes cuando el valor de p fue menor a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Los datos fueron analizados con el paquete estadístico *GraphPad Prism Software 5* (San Diego, CA, USA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Se estudiaron 19 pacientes que ingresaron al hospital San José de la ciudad de Popayán por sintomatología que infería sospecha de Paraparesia Espástica Tropical, de éstos, 9 cumplieron con el criterio de seropositividad para el virus HTLV-I (ELISA y Western Blot) (Anexo D). De los pacientes confirmados para PET/HAM, el 55,6% fueron hombres y el 44,4% mujeres, con un rango de edad de 32-79 años (mediana de 58,8 años), el 44,4% refirió vivir en zona urbana. Al revisar los antecedentes de riesgo de infección por HTLV-I, se confirmó que el 75% de los pacientes había recibido transfusión de sangre al menos una vez en el transcurso de la vida. En cuanto a los síntomas neurológicos, el 55,6% de pacientes presentó parestesias en miembros inferiores y alteraciones en la marcha y el 66,6% signo de Babinski positivo. Referente a los síntomas urológicos, el 55,6% de pacientes presentó incontinencia urinaria y el 33,3% disfunción eréctil (Ver tabla 5). Cada paciente se apareó con un control, de acuerdo con los criterios antes enunciados en la metodología.



**TABLA 5.** Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con PET/HAM y controles sanos

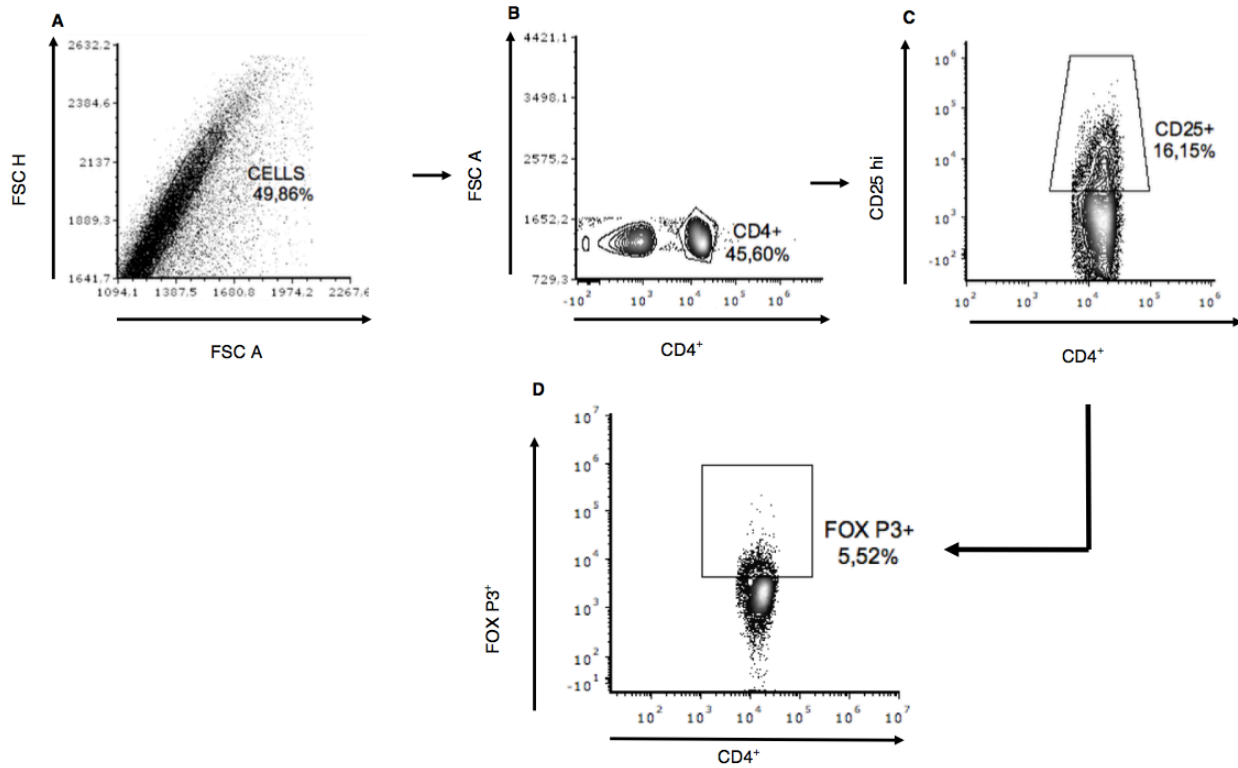
		<b>PET/HAM (n=9) n (%)</b>	<b>Controles (n=9) n (%)</b>
<b>MASCULINOS</b>		5 (55.6)	4 (44.4)
<b>FEMENINOS</b>		4 (44.4)	5 (55.6)
<b>MEDIANA DE EDAD Y RANGO</b>		58.8 (32-79)	57.6(31-18)
<b>RESIDENCIA</b>	<b>URBANA</b>	4(44.4)	8(88.8)
	<b>RURAL</b>	5 (55.6)	1 (11.1)
<b>* ICM (KG/M2)</b>	<b>NORMAL</b>	6 (66.7)	4 (44.4)
	<b>BAJO PESO</b>	0 (0)	0 (0)
	<b>SOBREPESO</b>	3(33.3)	5(55.5)
	<b>OBESIDAD</b>	0 (0)	0 (0)
<b>ANT LACTANCIA MATERNA</b>		4(44.4)	8 (88.8)
<b>USO DE DROGAS IV</b>		0(0)	0(0)
<b>ANTEC. DONACIÓN SANGRE</b>		3(33.3)	4 (44.4)
<b>ACTIVIDAD HOMOSEXUAL</b>		0(0)	0 (0)
<b>ANTEC. TRANSFUSIÓN</b>		6 (75)	0(0)
<b>SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS</b>	<b>PARAPARESIA ESPÁSTICA MI</b>	5 (55.6)	
	<b>PARESTESIAS MI **</b>	5 (55.6)	0
	<b>ALTERACIONES EN MARCHA</b>	5 (55.6)	0
	<b>SIGNO DE BABINSKI</b>	6 (66.6)	0
	<b>NORMOTONIA MI</b>	2 (22.2)	0
	<b>HIPERTONÍA MI</b>	1 (11.1)	0
	<b>HIPOTONÍA MI</b>	5 (55.6)	0
	<b>HIPORREFLEXIA MI</b>	1 (11.1)	0
	<b>HIPERREFLEXIA MI CON O SIN CLONUS</b>	6 (66.6)	0
	<b>SIGNOS CEREBELOS</b>	2 (22.2)	0
<b>SÍNTOMAS UROLÓGICOS</b>	<b>ALT PARES CRANEALES</b>	1 (11.1)	0
	<b>INCONTINENCIA</b>	5 (55.6)	0
	<b>DISFUNCIÓN ERÉCTIL</b>	3 (33.3)	0

\*ICM: índice de masa corporal; \*\*MI: miembros inferiores

## 6.2. CUANTIFICACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS T Y B REGULADORAS CIRCULANTES

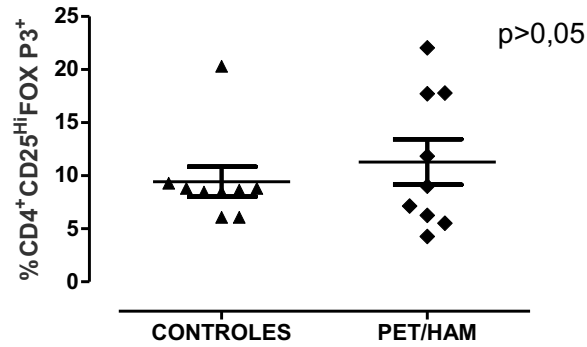
### 6.2.1. Cuantificación de células T reguladoras (Treg) $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ en pacientes con PET/HAM y en controles sanos

La frecuencia de células Treg fue evaluada en el linaje celular  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$  en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con PET/HAM y sus respectivos controles, la estrategia de análisis se puede evidenciar en la figura 3.



**Figura 3. Cuantificación mediante citometría de flujo de células Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$  en células mononucleares de sangre periférica.** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células  $CD4^+$  fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B); posteriormente, a partir de las células  $CD4^+$  se realizó un nuevo gráfico de contorno del cual se seleccionaron las células positivas para  $CD4^+$  y  $CD25^{hi}$  (C). De esta región se cuantificó el porcentaje de células  $FOXP3^+$  en relación a las células  $CD4^+$  (D).

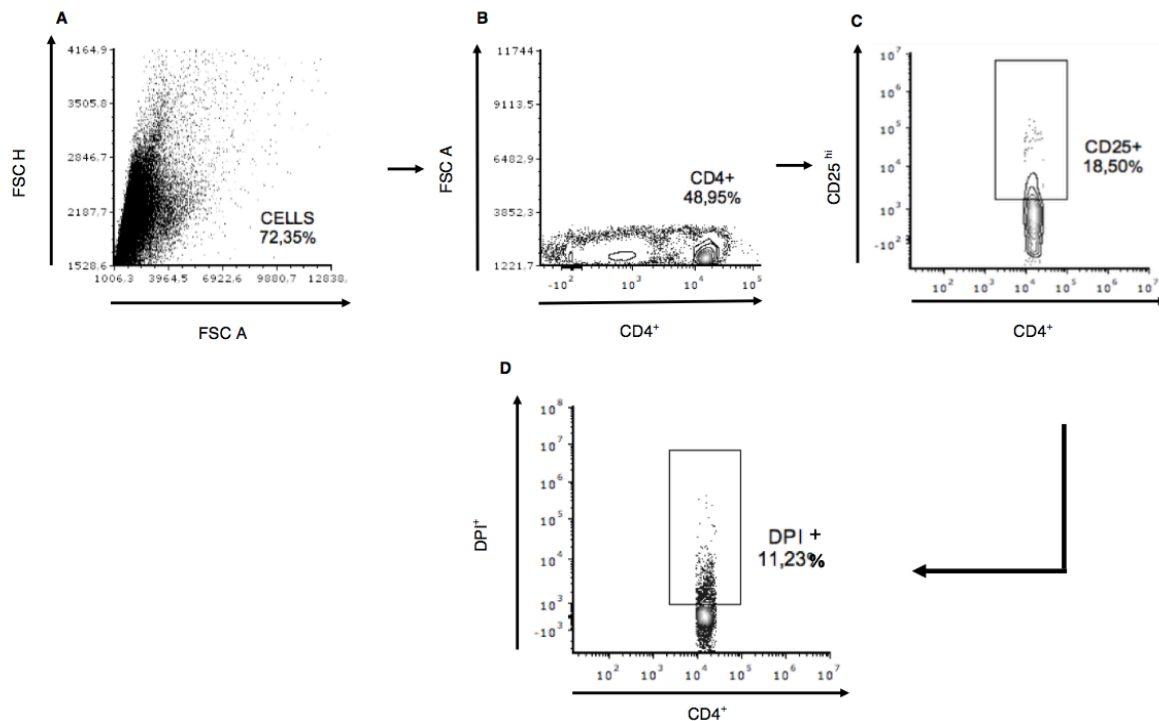
Al confrontar la frecuencia de las Treg con fenotipo  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$  entre pacientes con PET/HAM e individuos sanos, no se observó una diferencia significativa entre ellos (Figura 4).



**Figura 4. Porcentaje de células Treg  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$**  en 9 controles sanos (triángulo) y 9 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido para cada persona de cada grupo, las líneas horizontales representan la mediana y los intervalos intercuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney, con valores de  $p < 0,05$ .

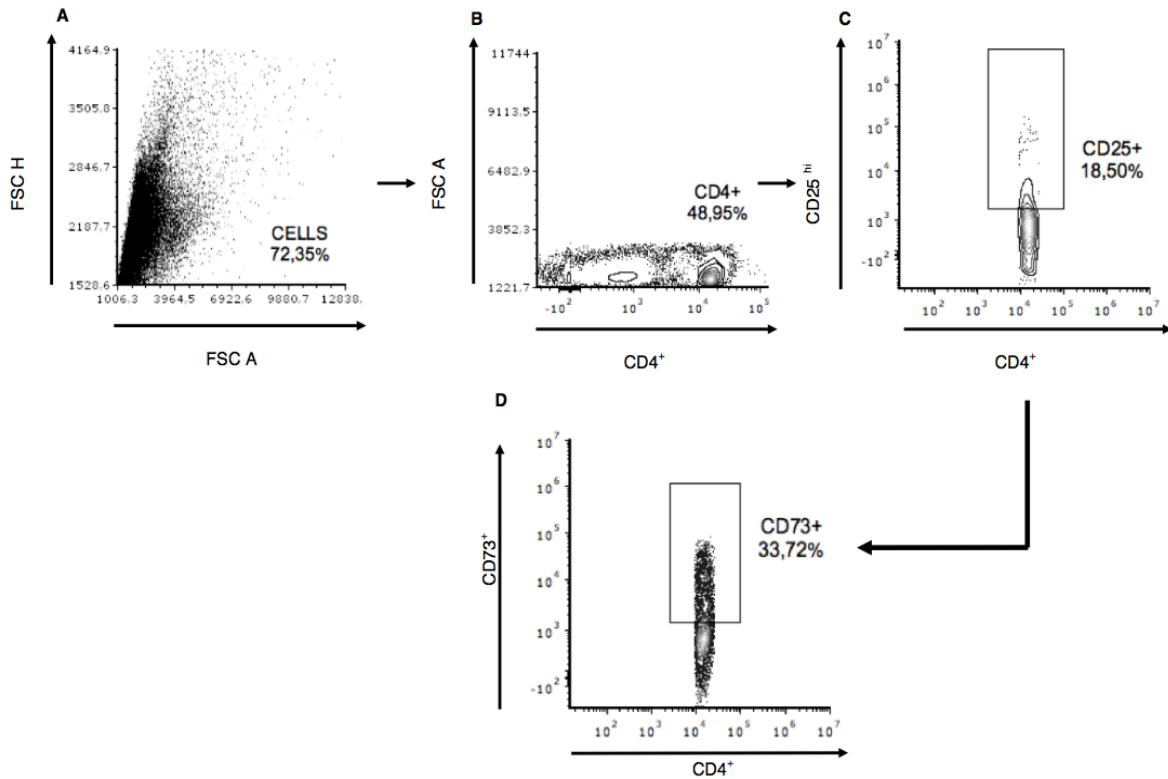
### 6.2.2. Cuantificación de la frecuencia de las células Treg $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$ y $CD4^+CD25^{hi}CD73^+$ en pacientes con PET/HAM y controles sanos

Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de células Treg con fenotipos  $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$  y  $CD4^+CD25^{hi}CD73^+$ , la frecuencia de estas células fue evaluada como se observa en las figuras 5 y 6, respectivamente.



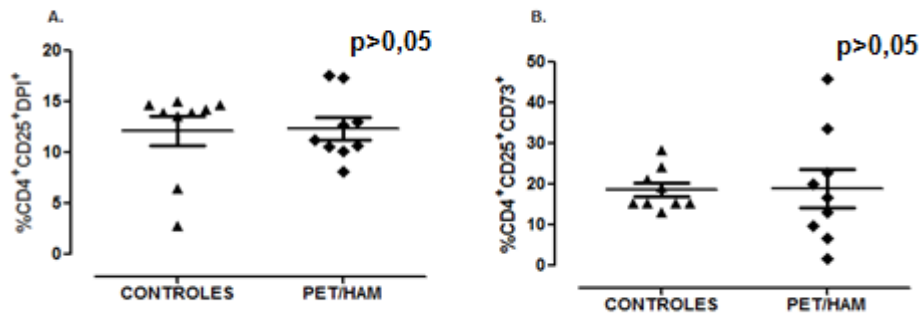
**Figura 5. Caracterización mediante citometría de flujo de la subpoblación celular Treg  $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$** . El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno en donde se seleccionaron los linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células  $CD4^+$  fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B); posteriormente, a

partir de las células CD4<sup>+</sup> se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>hi</sup> (C). Finalmente se realizó otro gráfico de contorno a partir de estas para la cuantificación de la expresión de DPI<sup>+</sup> en relación a las células CD4<sup>+</sup> (D).



**Figura 6. Caracterización mediante citometría de flujo de la subpoblación celular Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD73<sup>+</sup>.** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno en donde se seleccionaron los linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células CD4<sup>+</sup> fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B); posteriormente, a partir de las células CD4<sup>+</sup> se seleccionaron las células CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>hi</sup> (C). Finalmente se realizó otro gráfico de contorno a partir de estas para la cuantificación de la expresión de CD73<sup>+</sup> en relación a las células CD4<sup>+</sup> (D).

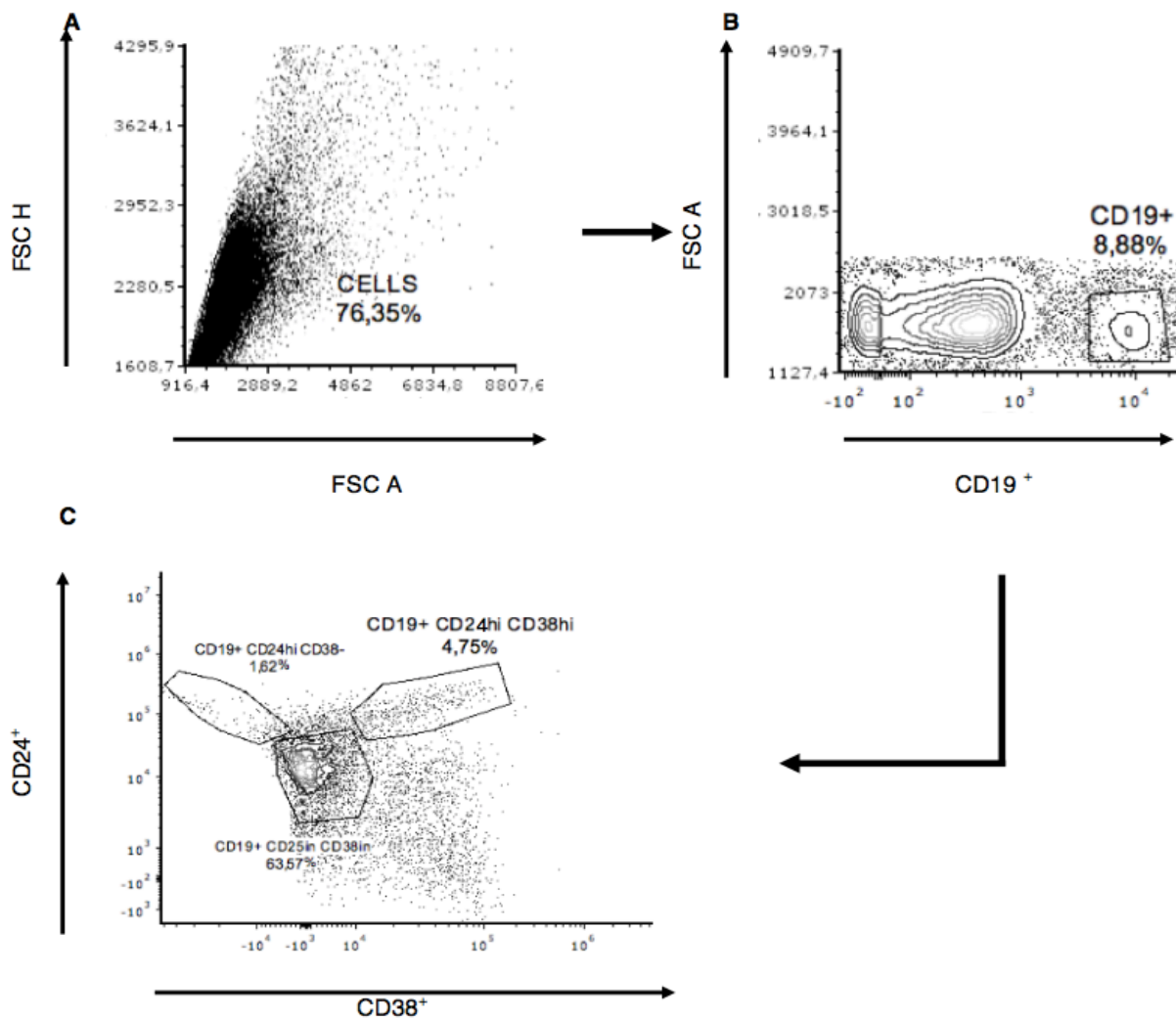
Al realizar la comparación entre los fenotipos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>DPI<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD73<sup>+</sup> de pacientes con PET/HAM y los individuos sanos, no se evidenció una diferencia significativa entre los grupos, como se muestra en la figura 7.



**Figura 7. Porcentaje de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Hi</sup>DPI<sup>+</sup> (A) y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Hi</sup>CD73<sup>+</sup> (B) en 9 controles sanos (triángulo) y en 9 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido para un individuo de cada grupo, las líneas horizontales refieren la mediana y los intervalos intercuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney, con valores de p<0,05.**

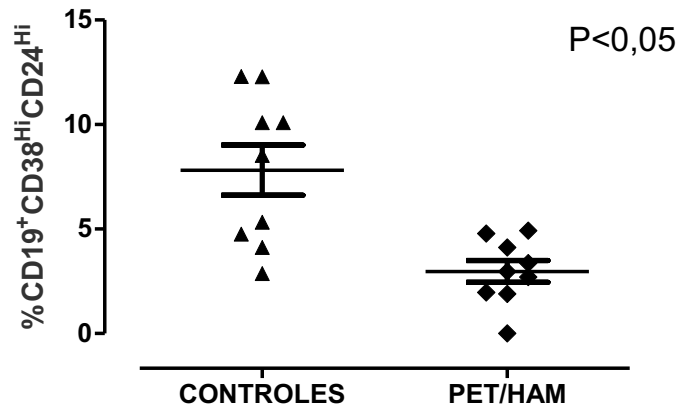
### 6.2.3. Cuantificación de la frecuencia de células B reguladoras (Breg) circulantes

Se cuantificó la frecuencia de células Breg con fenotipo CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> en células mononucleares de sangre periférica de pacientes PET/HAM y controles sanos. El análisis se realizó mediante Citometría de flujo como se muestra en la figura 8.



**Figura 8. Cuantificación de células Breg con fenotipo  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  en células mononucleares de sangre periférica.** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células  $CD19^+$  fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B). Finalmente se realizó un gráfico de contorno correspondiente a las células  $CD19^+$  en función de las células  $CD38^+$  y  $CD24^+$  con el fin de identificar la región  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  correspondiente a las células Bregs (C).

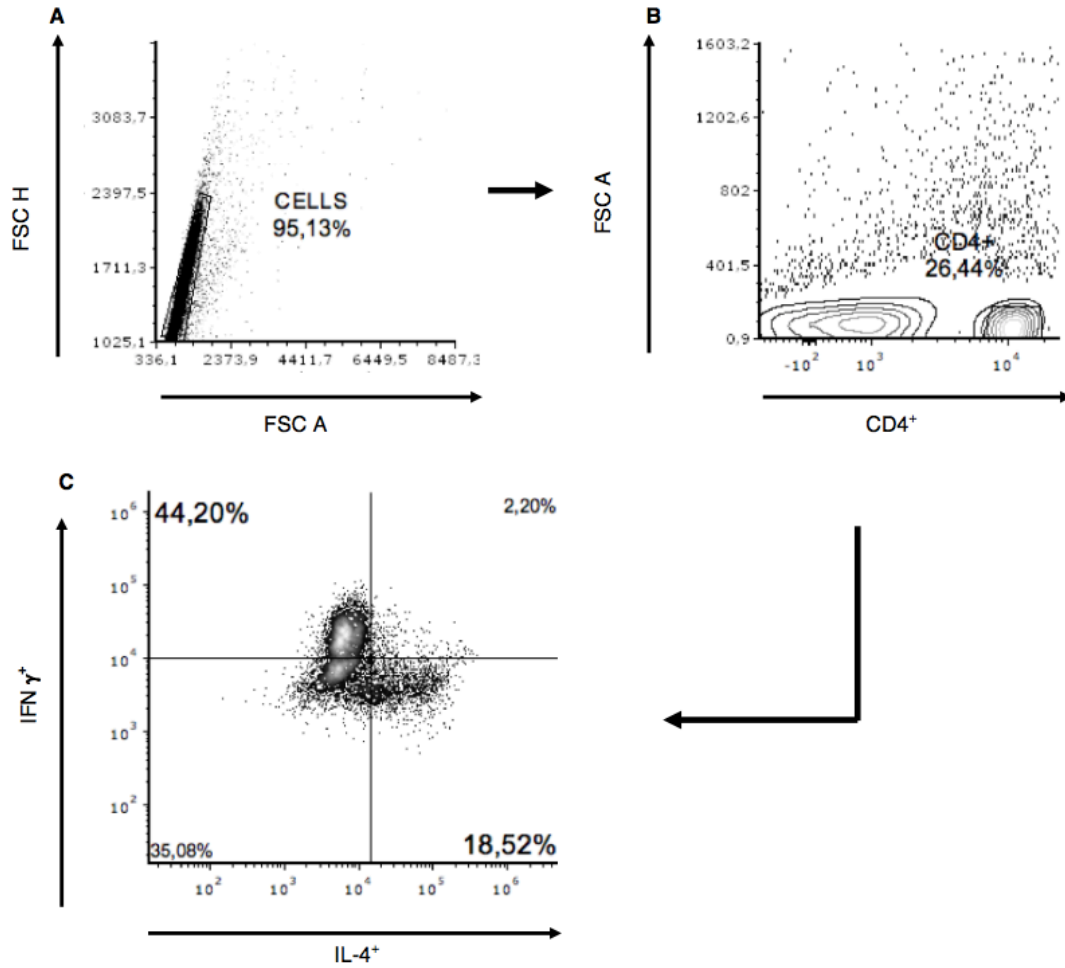
Al comparar los porcentajes de las células Breg con fenotipo  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  entre los pacientes con PET/HAM y los controles sanos, se evidenció que los pacientes presentaron menor porcentaje de esta subpoblación celular respecto a los controles (figura 9; Tabla 6).



**Figura 9. Porcentaje de células Breg  $CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}$**  en 9 controles (triángulo) y 9 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido por un individuo de cada grupo, las líneas horizontales indican la mediana y los cuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney con valores de  $p < 0,05$ .

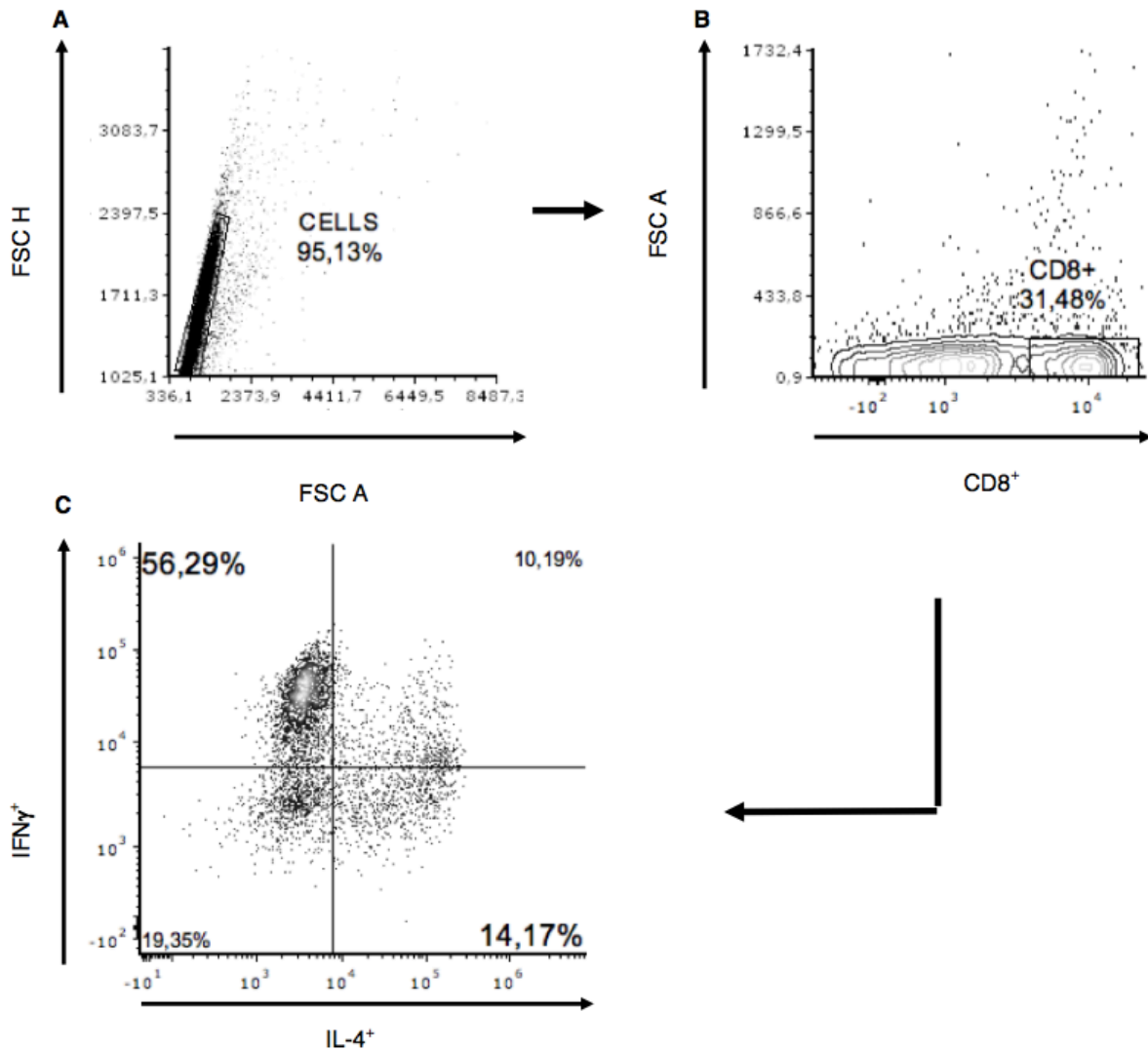
#### 6.2.4. Cuantificación de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$ e IL-4

Se cuantificó el porcentaje de células T productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>. Las figuras 10 y 11, representan la estrategia de análisis por Citometría de flujo de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>.



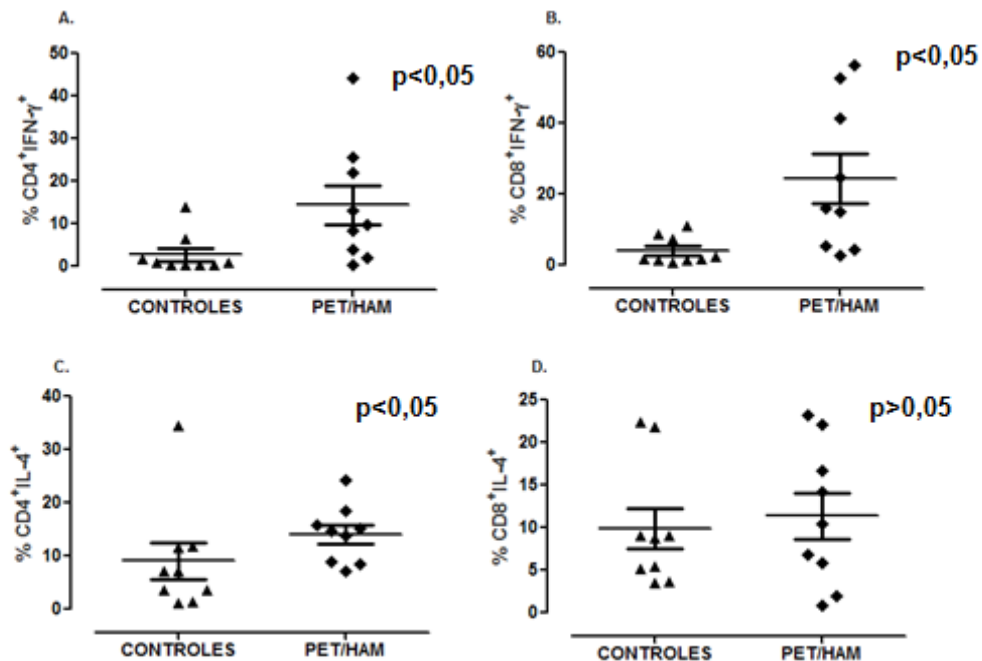
**Figura 10. Cuantificación de la frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  e IL-4.** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células CD4<sup>+</sup> fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B). Finalmente se realizó otro gráfico de contorno con el fin de identificar aquellas células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 (C).





**Figura 11. Cuantificación de la frecuencia de linfocitos CD8<sup>+</sup> productores de IFN-γ e IL-4.** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células CD8<sup>+</sup> fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B). Finalmente se realizó otro gráfico de contorno con el fin de identificar aquellas células productoras de IFN-γ e IL-4 (C).

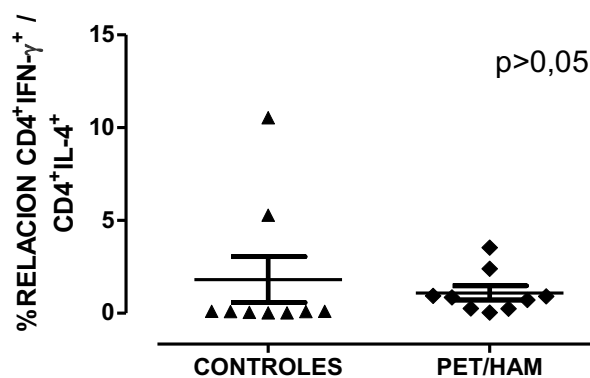
Al comparar las frecuencias de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN-γ e IL-4, se evidenció que los pacientes PET/HAM presentaron una mayor frecuencia de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN-γ en comparación con los controles sanos. (Figura 12A y 12B). En cuanto a la producción de IL-4, los pacientes PET/HAM presentaron mayor porcentaje de células CD4<sup>+</sup> productoras IL4 en comparación a los controles sanos (Figura 12C), mientras que no hubo diferencias significativas en la producción de IL4 por las células CD8<sup>+</sup> entre las poblaciones estudiadas (figura 12D) (Tabla 7).



**Figura 12. Porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IFN-γ (A y B) e IL-4 (C y D) en 9 controles sanos (triángulo) y 9 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido para un individuo de cada grupo, las líneas horizontales indican la mediana y los cuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney con valores de  $p < 0,05$ .**

### 6.2.5. Comparación de la relación entre el porcentaje de células CD4<sup>+</sup>IFN-γ sobre el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> IL4<sup>+</sup>

Al realizar una comparación entre la relación del porcentaje de células CD4<sup>+</sup>IFN-γ sobre el porcentaje de células IL4<sup>+</sup>, no se evidenció una diferencia significativa entre los grupos de estudio (Figura 13).

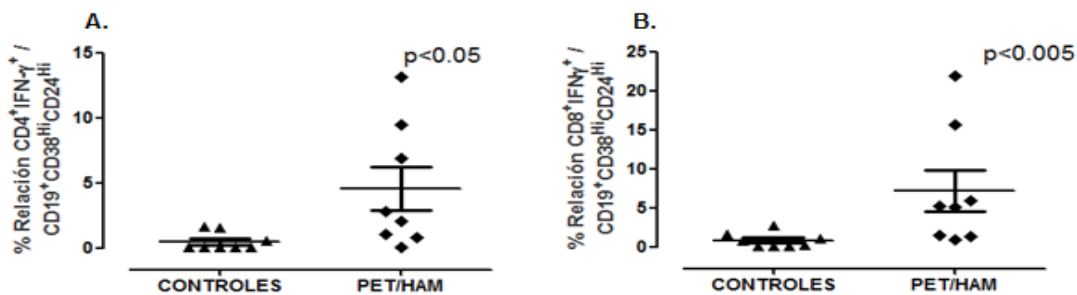


**Figura 13. Relación del porcentaje de células CD4<sup>+</sup>IFN-γ/ CD4<sup>+</sup> IL4<sup>+</sup> en 9 controles sanos (triángulo) y 9 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido para un individuo de cada grupo, las líneas**

horizontales indican la mediana y los cuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney con valores de  $p < 0,05$ .

### 6.2.6. Comparación de la relación entre el porcentaje de células $CD4^+IFN-\gamma$ y $CD8^+IFN-\gamma$ sobre el porcentaje de células Bregs

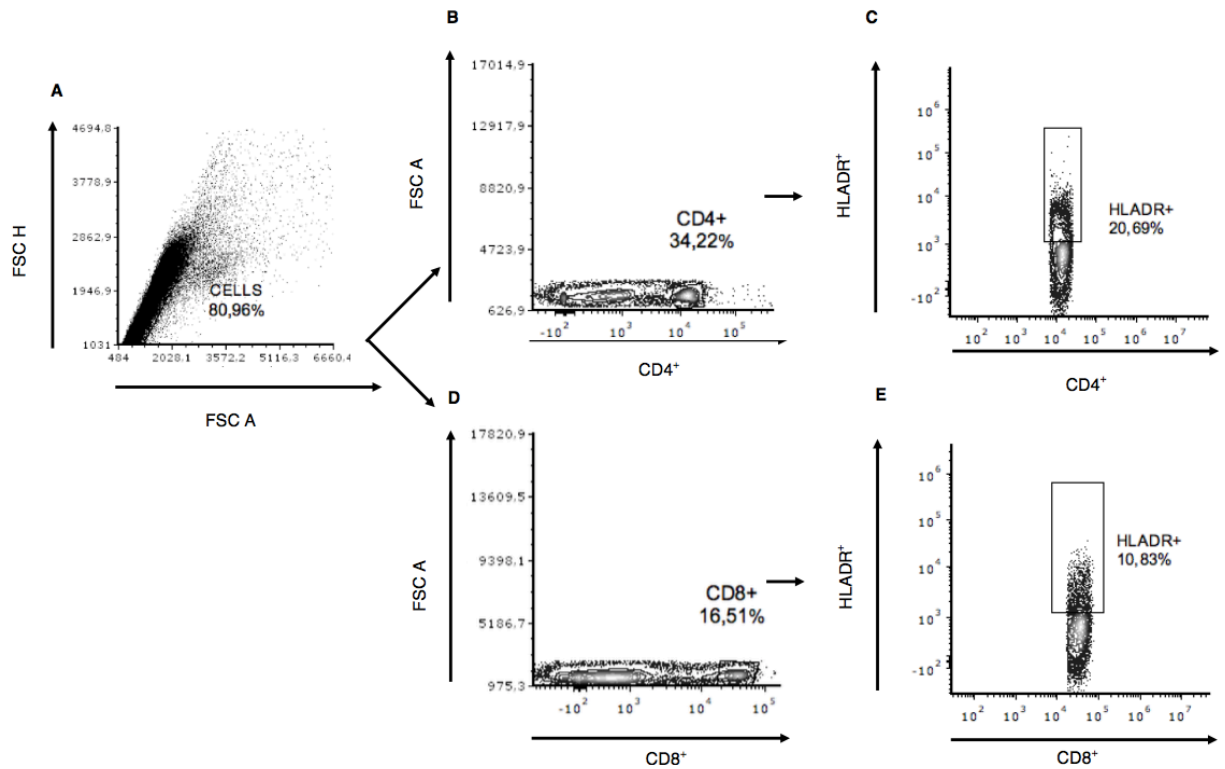
Al realizar una comparación entre la relación del porcentaje de células  $CD4^+IFN-\gamma$  y  $CD8^+IFN-\gamma$  sobre el porcentaje de células Bregs, se encontró una diferencia significativa con un valor de  $p < 0,05$  para ambos casos (Figura 14).



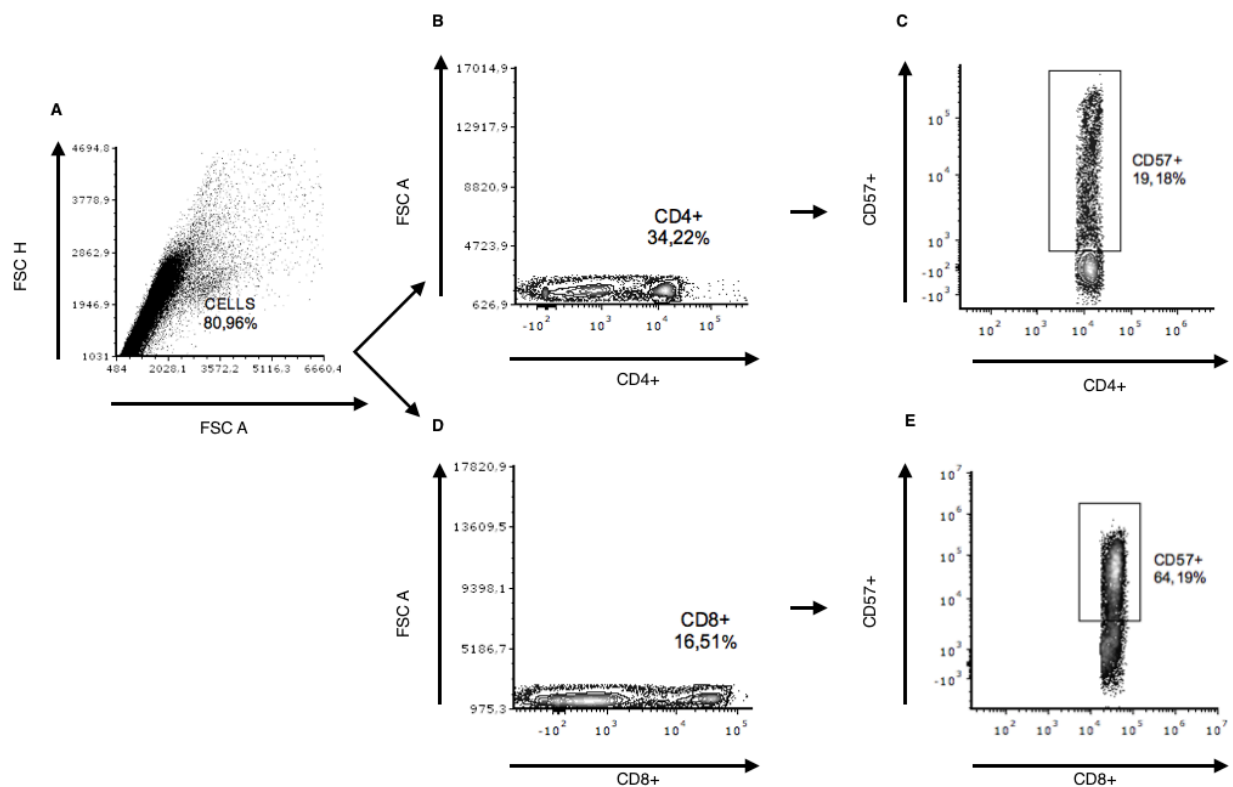
**Figura 14.** Relación del porcentaje de células  $CD4^+IFN-\gamma / CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}$  (A) y  $CD8^+IFN-\gamma / CD19^+CD38^{hi}CD24^{hi}$  (B) en 8 controles sanos (triángulo) y 8 pacientes con PET/HAM (rombo). Cada punto representa el valor obtenido para un individuo de cada grupo, las líneas horizontales indican la mediana y los cuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney con valores de  $p < 0,05$ .

### 6.2.7. Cuantificación de la frecuencia de células T activadas y senescentes

Se identificó el porcentaje de células activadas y senescentes por la expresión de HLADR y CD57 en linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en pacientes con PET/HAM y controles sanos. Las figuras 15 y 16 muestran la estrategia de análisis para los fenotipos  $CD4^+HLADR^+$ ,  $CD8^+HLADR^+$  y  $CD4^+CD57^+$ ,  $CD8^+CD57^+$ , respectivamente.

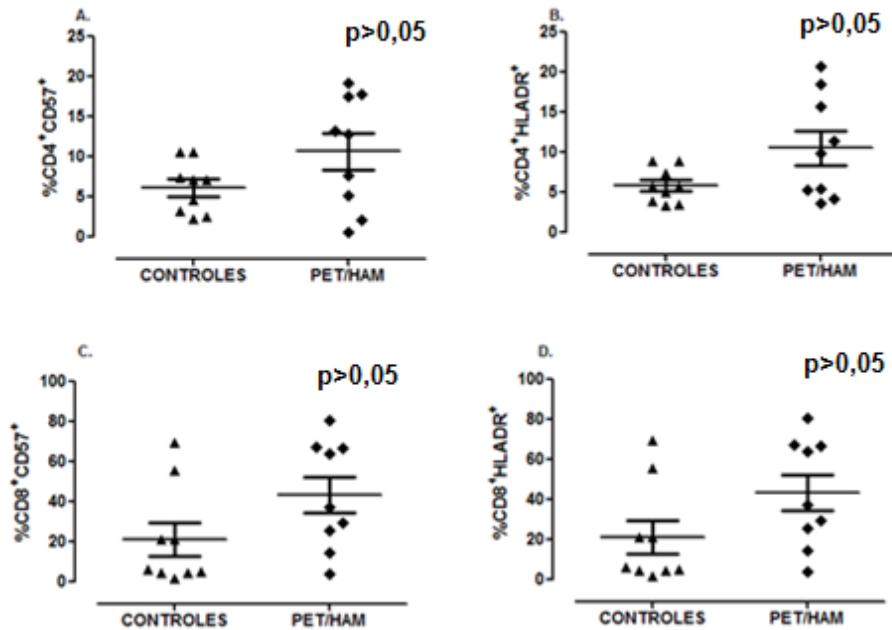


**Figura 15. Cuantificación mediante citometría de flujo de las subpoblaciones celulares  $CD4^+HLA-DR^+$ ,  $CD8^+HLA-DR^+$ .** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B y C); posteriormente, se realizó un gráfico de contorno para la cuantificación de la expresión de células  $CD4^+HLADR^+$  (D) y  $CD8^+HLADR^+$  (E).



**Figura 16. Cuantificación mediante citometría de flujo de las subpoblaciones celulares  $CD4^+CD57^+$  y  $CD8^+CD57^+$ .** El análisis se llevó a cabo a través de un esquema de contorno donde se seleccionó la población de linfocitos en función de FSC-A y FSC-H (A). A partir de ello, células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  fueron seleccionadas en relación a FSC-A (B y C); posteriormente, se realizó un gráfico de contorno para la cuantificación de la expresión de células  $CD4^+CD57^+$  (D) y  $CD8^+ CD57^+$  (E).

Al comparar las frecuencias de las células T activadas y senescentes en pacientes con PET/HAM y controles sanos, no se evidenció diferencias significativas (Figura 17).



**Figura 17. Porcentaje de células T activadas y senescentes** en 9 controles (triángulo) y 9 pacientes con PET/HAM (rombo). CD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> (B), CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (C) y CD8<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> (D). Cada punto representa el valor obtenido para un individuo de cada grupo, las líneas horizontales indican la mediana y los cuartiles. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Manne Whitney con un valor de  $p < 0,05$ .

**Tabla 6. Porcentaje de fenotipos de células T y B reguladoras en pacientes con PET/HAM comparado con controles sanos**

% Células	PET/HAM		CONTROLES SANOS		Valor P
	% Mediana	% IQR	% Mediana	% IQR	
%CD19 <sup>+</sup> CD24 <sup>hi</sup> CD38 <sup>hi</sup>	2,96	(1,92-4,45)	7,25	(4,27-19,09)	0,0123
%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD73 <sup>+</sup>	18,94	(8,28-28,30)	19,01	(15,28-23,52)	0,7361
%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> FOXP3 <sup>+</sup>	11,29	(5,88-17,76)	9,86	(8,47-9,17)	0,9616
%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> DPI <sup>+</sup>	12,36	(10,3-15,1)	11,9	(8,22-14,64)	0,5964

Los valores representan la mediana (rango intercuartil) de los porcentajes de fenotipos celulares de 9 pacientes con PET/HAM y 9 controles sanos. Estos datos fueron analizados por medio de la prueba U de Manne Whitney. Con un valor de  $P < 0,05$

**Tabla 7.** Porcentaje de fenotipos celulares en pacientes con PET/HAM comparado con controles sanos.

% Células	PET/HAM		CONTROLES SANOS		Valor P
	% Mediana	% IQR	% Mediana	% IQR	
CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	14,36	(2,99-23,79)	3,041	(2,25-5,35)	0,0237
CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	24,37	(4,99-47,03)	4,35	(1,51-8,34)	0,0107
CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup>	14,10	(8,65-17,21)	9,81	(1,90-11,74)	0,0484
CD8 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup>	11,35	(3,93-19,40)	10,66	(5,27-18,61)	0,8098
CD4 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	10,53	(4,70-17,13)	5,854	(3,6-8,55)	0,1121
CD8 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup>	8,66	(5,83-11,11)	9,69	(7,85-11,19)	0,5314
CD4 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	10,65	(3,64-17,62)	6,02	(2,71-9,76)	0,1937
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	43,31	(20,11-67,08)	23,14	(4,52-47,02)	0,1356

Los valores representan la mediana (rango intercuartil) de los porcentajes de fenotipos celulares de 9 pacientes con PET/HAM y 9 controles sanos. Estos datos fueron analizados usando la U de Manne Whitney, con un valor de  $p < 0,05$ .

## 7. DISCUSIONES

Este estudio tuvo como objetivo: Evaluar la frecuencia de células T y B reguladoras circulantes y funciones efectoras de los linfocitos T en individuos con paraparesia espástica tropical (PET/HAM) e individuos sanos, para esto, se evaluó y cuantificó, la frecuencia de diferentes subgrupos celulares como las células T reguladoras (Treg) con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>; Treg asociadas a la expresión de CD73 y DPI; y las células B reguladoras (Breg) con fenotipo CD19<sup>+</sup>CD24<sup>Hi</sup>CD38<sup>Hi</sup>. Adicionalmente, se evaluó la respuesta efectora de las células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), en cuanto a la expresión de las citoquinas IL-4 e IFN- $\gamma$ ; así como los marcadores de activación y senescencia HLADR y CD57, respectivamente.

Las células T reguladoras son reconocidas por expresar el factor transcripcional FOXP3; éstas se conocen por su acción reguladora en procesos de la inmunidad adaptativa, tales como la tolerancia y homeóstasis celular (Toulza *et al.*, 2008; Kleinewietfeld and Hafler, 2014; Pereira *et al.*, 2017). En la fisiopatología de la PET/HAM este tipo de células se han reportado alteradas (Bangham *et al.*, 2015a); Por ejemplo, Yamano *et al.* (2009) determinó que la producción de FOXP3 fue baja en el linaje celular CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CCR4<sup>+</sup>, postulando al CCR4 como un receptor de membrana presente en las células CD4<sup>+</sup> infectadas por el virus HTLV-I, resultados que fueron corroborados por Araya *et al.* (2014). En contraste con estos aportes, otros estudios indican alta frecuencia de FOXP3 en células TCD4<sup>+</sup> infectadas por el virus de pacientes con PET/HAM (Toulza *et al.*, 2008), más adelante, el mismo autor, relaciona este hecho como consecuencia de la activación de la proteína viral TAX y relaciona dicha proteína con la activación de la quimiocina CCL22, que a su vez prolonga la supervivencia de las células T reguladoras mediante la interacción con el receptor de membrana CCR4 (Toulza *et al.*, 2010; Bangham *et al.*,

2015a). Los resultados encontrados en el presente estudio, donde no se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de células  $CD4^+CD25^{Hi}FOXP3^+$  al comparar pacientes con PET/HAM y controles, no son comparables con los resultados reportados en la literatura científica hasta el momento, debido a que para este estudio se cuantificaron las células  $CD4^+CD25^{Hi}FOXP3^+$  en el total de células mononucleares aisladas de pacientes y controles, sin discriminar si estas se hallaban infectadas, lo que nos hace intuir que el virus afecta la expresión de FOXP3 directamente en las células infectadas, sin afectar de manera directa o indirecta las células no infectadas del mismo fenotipo.

Las células T reguladoras además de expresar FOXP3, expresan proteínas integrales de membrana también características de este linaje. Entre ellas se encuentran los marcadores CD39 y CD73, cuya función es fosforilar ATP en ADP, y ADP en AMP (Beavis *et al.*, 2012); su papel en la regulación inmune es mediar la supresión inmunológica y activar la respuesta antiinflamatoria (Antonlioli *et al.*, 2013) Otro marcador de interés en la función regulatoria de las células Tregs es el DPI, el cual se conoce como un receptor de tipo inhibidor-inmune que promueve la diferenciación de células *Tnaive* a células Treg inducibles (Zhang *et al.*, 2016). La deficiencia de este receptor se asocia con fenómenos de autoinmunidad por pérdida de la auto-tolerancia (Zhang *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los resultados obtenidos de la cuantificación de CD73 y DPI no presentaron una diferencia significativa con respecto a los controles. Respecto a CD73, es importante resaltar que a la fecha no existe ningún reporte que haya estudiado este fenotipo celular en pacientes PET/HAM, por lo tanto no existe un punto de comparación para los resultados aquí reportados. Sin embargo, Leal *et al.* (2013) reportan mayor frecuencia de células con fenotipo celular  $CD39^+CD25^+CD4^+$  en pacientes PET/HAM, dato interesante, debido a que CD39 comparte la misma función que CD73. Lo anterior nos podría indicar que la expresión de CD73 no se relacionan con el proceso fisiopatológico de la enfermedad, mientras que CD39 parece tener un papel preponderante, sin embargo se requieren más estudios para establecer una conclusión final.

Los procesos de inmunidad no solo se median a partir de las células Treg, ya que las células Bregs con fenotipo  $CD19^+CD25^{hi}CD38^{hi}$  también se caracterizan por su capacidad reguladora e inmunosupresora al regular la proliferación y diferenciación de las células tipo Th1 (Mauri and Bosma, 2012; Shen *et al.*, 2014). Las células Bregs no han sido descritas en la PET/HAM, por lo cual el presente estudio describe por primera vez la frecuencia de este subtipo celular en la patología. Los resultados observados indican que los pacientes tienen un menor porcentaje de células Breg ( $CD19^+CD25^{hi}CD38^{hi}$ ) comparado con los controles. Este comportamiento se asemeja a los resultados reportados para este linaje celular en otro tipo de patologías también de carácter inflamatorio autoinmune, tales como: lupus eritematoso sistémico (Blair *et al.*, 2010), esclerosis múltiple (Staun-Ram and Miller, 2017), artritis (Mavropoulos *et al.*, 2017), en donde se encontró disminuido este linaje celular. La reducción de células Bregs en pacientes con PET/HAM podría estar asociada a defectos en la regulación de las células tipo Th1, lo cual se ha demostrado desencadena un proceso fisiológico que



concluye en daño tisular causado principalmente por el aumento de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ .

Debido a que la respuesta tipo Th1 asociada a la producción de IFN- $\gamma$  participa en la fisiopatología de PET/HAM, los resultados obtenidos de la evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> de pacientes e individuos sanos, mostraron un incremento significativo en pacientes, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Bangham *et al.*, 2015a), esto puede deberse a un fenómeno de plasticidad celular, explicado por Yamano y Coler-Reilly (2017) quienes demostraron que las células T reguladoras infectadas por el virus HTLV-1 con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> disminuyen su expresión como consecuencia a la activación de la proteína viral Tax, que a su vez activa la expresión del factor de transcripción T-bet, cuya función principal es disminuir la expresión de FOXP3 e incrementar la producción de IFN- $\gamma$ , observándose un fenómeno de plasticidad celular donde las células se convierten a un fenotipo Th1-Like (Yamano and Coler-Reilly, 2017).

Igualmente, los resultados obtenidos en este estudio muestran el incremento significativo de linfocitos TCD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en pacientes con respecto a los controles. Estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos por Kubota *et al.* (2003) y Hanon *et al.* (2001), quienes relacionaron los linfocitos TCD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  con el incremento de la proteína viral Tax en la infección por el HTLV-I, ya que la expresión de IFN- $\gamma$  tiende a incrementar conforme al aumento de la actividad de Tax, lo que pudiese explicar el por qué esta citoquina se incrementó considerablemente en pacientes y la baja producción que se presentó en controles sanos.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la alta producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en pacientes con PET/HAM ha sido reportado anteriormente (Hanon *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2003; Araya *et al.*, 2014; Bangham *et al.*, 2015a; Yamano and Coler-Reilly, 2017); se realizó un análisis de la correlación existente entre las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras IFN- $\gamma$  y las células Bregs, esta correlación mostró ser significativamente alta en pacientes comparado con controles sanos. Así, las células Breg se encontraron en cantidades reducidas en pacientes con PET/HAM, lo que podría estar relacionado al incremento de IFN- $\gamma$  en pacientes, lo que concuerda con lo evidenciado en otras enfermedades como el lupus eritematoso (Blair *et al.*, 2010).

En pacientes con PET/HAM hay un predominio de citoquinas tipo Th1 y una reducción de citoquinas tipo Th2, esto es probablemente causado por la abundante circulación de células inmunes entre la sangre periférica y el sistema nervioso central, lo que conduce a una inflamación del tejido nervioso (Ahuja *et al.*, 2007). No obstante, nuestros resultados mostraron que la subpoblación de células TCD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> fue mayor en pacientes con PET/HAM comparado con los controles sanos. Adicionalmente, se realizó un análisis de la correlación existente entre las células TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y las células TCD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, este no presentó diferencias significativas entre los grupos de estudio, lo que indica que las proporciones de IFN- $\gamma$  e IL-4 en pacientes y controles son equivalentes. Por otra parte, en los linfocitos TCD8<sup>+</sup> no hubo diferencias en cuanto a la producción de IL-4, este

resultado concuerda con los hallazgos de Furuya *et al.* (1999). Ochi *et al.* (2001) y Santos *et al.* (2004), en donde se analizó la producción de IL-4 en linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> determinando que no existía una diferencia exacerbada de esta citoquina en pacientes en comparación con los controles sanos. En conclusión, el presente estudio, así como los anteriores reportes de la literatura indican que la IL-4 no presenta un rol esencial en la PET/HAM.

La estimulación de células T conduce a la expresión de moléculas conocidas como marcadores de activación, entre estas la expresión de HLA-DR, la cual se expresa después de la activación vía presentación antigénica (Salgado *et al.*, 2002). Por otro lado, la estimulación antigénica crónica promueve acumulación de células T antígeno específico que se caracterizan por tener telómeros acortados, pérdida de CD28 y/o expresión de CD57. La molécula CD57 juega un papel importante como marcador asociado a activación inmune crónica en diversas enfermedades o afecciones (Strioga *et al.*, 2011). Con el fin de conocer el perfil de activación y senescencia de los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en pacientes con PET/HAM, se cuantificaron los fenotipos CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>, sin embargo, no se evidenció diferencia significativa entre ninguno de ellos.

En 1990 se obtuvieron los primeros resultados en los que de indicaba que la expresión de HLADR e IL2R en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se elevaba en pacientes con PET/HAM en comparación con controles sanos (Jacobson *et al.*, 1990). En cuanto a la expresión de HLADR en células TCD8<sup>+</sup>, se demostró que los linfocitos CD8<sup>+</sup>Tax<sup>+</sup> de pacientes con PET/HAM expresaban el antígeno HLADR en mayor proporción que las de personas sanas (Greten *et al.*, 1998; Brito-Melo *et al.*, 2004). Nagai *et al.* (2001) Reportaron que el porcentaje de células positivas para HLADR en células CD8<sup>high</sup> totales de pacientes con PET/HAM fue significativamente mayor en comparación con los controles sanos.

Referente a la expresión de HLADR en linfocitos TCD4<sup>+</sup>, Michaëlsson *et al.* (2008), investigaron la expresión de Ki-67, HLADR y CD38 en células T CD4<sup>+</sup> en PBMC de donantes sanos (Control), pacientes infectados con HTLV-1 clínicamente asintomáticos (HTLV) y personas con PET/HAM. El análisis de los resultados mostró que los pacientes PET/HAM tenían mayor frecuencia de células TCD4<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup> en comparación con los pacientes asintomáticos o los donantes de control. Además, los pacientes PET/HAM presentaron un aumento en la frecuencia de las células TCD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> en comparación con los controles, mientras que no se observó diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de células TCD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>.

Otros estudio han mostrado resultados contradictorios sobre la identificación de moléculas activadoras, en los que por ejemplo, la proporción de linfocitos CD8<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> en pacientes HTLV-I positivos asintomáticos, en comparación con los controles sanos, no tuvo diferencias significativas, mientras que los linfocitos TCD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> si (Coutinho *et al.*, 2014). De manera contraria, el estudio de Brito-Melo *et al.*, (2004), realizó el análisis de células CD4<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> en individuos PET/HAM positivos (PH),

individuos HTLV-I positivos asintomáticos (AS), individuos HTLV-I positivos oligoasintomáticos (OS) y donadores sanos (DS), utilizando dos cohortes por grupo. Los resultados mostraron que el grupo PH tuvo un nivel de  $CD8^+HLADR^+$  significativamente mayor que todos los otros grupos evaluados. Respecto a las células  $CD4^+HLADR^+$ , los autores observaron mayor expresión en los individuos AS que en los DS, pero esta característica fenotípica no fue reproducible en la segunda cohorte, en la que el nivel de células  $CD4^+HLADR^+$  no tuvo cambios significativos entre los grupos (Brito-Melo *et al.*, 2004). Por último, un estudio realizado en linfocitos  $CD4^+CD25^+HLADR^+$  en pacientes PET/HAM y controles sanos, mostró que no hubo diferencias significativas en la expresión de HLADR entre ellos (Yamano *et al.*, 2005).

Sobre la frecuencia de células T en senescencia que expresan el marcador CD57 no se encontró diferencia entre los grupos estudiados. En infecciones virales crónicas como VIH, CMV, EBV, virus de la hepatitis C y parvovirus se ha reportado un exacerbado incremento de linfocitos  $TCD57^+$ , lo cual se correlaciona con la progresión a enfermedad y caída de la respuesta inmunológica (Labalette *et al.*, 1994; Manfras *et al.*, 2004; Isa *et al.*, 2005; Le Priol *et al.*, 2006; Petrova *et al.*, 2006). En la PET/HAM se reporta mayor frecuencias de linfocitos  $TCD57^+$  comparado con los asintomáticos infectados y controles sanos (Al-Fahim *et al.*, 1999). En el presente trabajo, los resultados obtenidos en la cuantificación de CD57 no presentaron una diferencia significativa con respecto a los controles, es importante resaltar que, durante el desarrollo de la práctica experimental, se realizó un cambio en el marcador debido a que el inicial se agotó, esto pudiese haber interferido en los resultados. Otro aspecto que pudo haber afectado el resultado del porcentaje de células  $TCD57^+$  es la edad de los pacientes y controles, ya que la mayoría superaban los 45 años, y se ha relacionado que a mayor edad, mayor expresión del marcador (Ferrando-Martínez *et al.*, 2011). En conclusión, y debido a que en nuestro estudio no se presentaron diferencias significativas entre los grupos analizados, esta característica fenotípica no puede ser considerada de utilidad diagnóstica o pronóstica dentro de nuestro grupo de pacientes, sin embargo, estudios de mayores dimensiones deberán ser realizados para aclarar el papel de la expresión de las moléculas HLADR y CD57 en las células de la respuesta inmune en la PET/HAM.

## CONCLUSIONES

Al comparar el porcentaje de células T reguladoras en pacientes y controles, no se evidencio diferencias significativas en el fenotipo  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$ , lo que contrasta con los resultados reportados por diversos autores, por lo que es importante indagar más en el comportamiento de este linaje celular a través de nuevas investigaciones.

Los resultados de la cuantificación de las subpoblaciones  $CD4^+CD25^{hi}CD73^+$  y  $CD4^+CD25^{hi}DPI^+$  no presentaron diferencias significativas, por lo que se podría afirmar que no guardan una estrecha relación con la PET/HAM.

En cuanto al porcentaje de células B reguladoras, se observó una diferencia significativa, en donde los pacientes presentaron menor cantidad de células con el fenotipo

CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> en relación a los controles. De manera interesante, los resultados del presente estudio son el primer reporte en la literatura sobre el comportamiento de este fenotipo celular en la PET/HAM, lo que ha coincidido con lo reportado para otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso, hepatitis B y esclerosis múltiple, sin embargo se requieren realizar estudios más detallados.

Respecto a la producción de IFN- $\gamma$ , en ambos subtipos celulares (TCD4 y TCD8), los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas, siendo mayor la expresión en pacientes en relación a controles, confirmando lo reportado por otros autores.

La producción de IL-4 en linfocitos TCD4<sup>+</sup> fue significativa siendo mayor en pacientes, por lo cual las proporciones de IFN- $\gamma$  e IL-4 se mantienen, sin embargo existe un predominio de IFN- $\gamma$  lo cual se correlaciona con la enfermedad. En linfocitos TCD8<sup>+</sup> no hubo diferencia significativa.

En cuanto a la activación y senescencia celular, no se observó diferencia significativa, es posible que su actividad no esté relacionada directamente con la patología de la enfermedad.

## **RECOMENDACIONES**

Es importante incrementar el tamaño de muestra para futuras investigaciones, ya que los resultados expuestos en el presente trabajo pueden mostrar una posible tendencia en el comportamiento de los subtipos celulares, sin embargo, no se puede generalizar estos datos al desarrollo y progresión de la enfermedad. El aumento del tamaño de muestra permitiría realizar análisis estadísticos con mayor detalle y con ello contribuir postulando blancos específicos a tratar durante el desarrollo de la PET/HAM.

Se sugiere para próximos estudios tener en cuenta el suministro de medicamentos desde la detección de la patología, ya que esto pudiese incidir en la veracidad de los resultados, puesto que generalmente la patología se asocia al consumo de anti inflamatorios.

Sería interesante realizar estudios donde se clasifiquen los pacientes, con el fin de diferenciar aquellos con diagnóstico inicial, tratamiento, progresión de la enfermedad y tiempo de padecimiento, además de esto, se sugieren incorporar estudios de funcionalidad celular que complementen estudios netamente descriptivos como este.

## BIBLIOGRAFÍA

- Afeltra, A., Galeazzi, M., DOMENICO SEBASTIANI, G., MARIA FERRI, G., Caccavo, D., ASSUNTA ADDESSI, M., Marcolongo, R., Bonomo, L., 1997. Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *International journal of experimental pathology* 78, 331-336.
- Ahuja, J., Lepoutre, V., Wigdahl, B., Khan, Z.K., Jain, P., 2007. Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. *Biomedicine & pharmacotherapy* 61, 201-208.
- Al-Fahim, A., Cabre, P., Kastrukoff, L., Dorovini-Zis, K., Oger, J., 1999. Blood Mononuclear Cells in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy: Lymphocytes Are Highly Activated and Adhesion to Endothelial Cells Is Increased. *Cellular Immunology* 198, 1-10.
- Ando, H., Sato, T., Tomaru, U., Yoshida, M., Utsunomiya, A., Yamauchi, J., Araya, N., Yagishita, N., Coler-Reilly, A., Shimizu, Y., 2013. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*, awt183.
- Ando, Y., Matsumoto, Y., Nakano, S., Saito, K., Kakimoto, K., Tanigawa, T., Ekuni, Y., Kawa, M., Toyama, T., 2003. Long-term follow up study of vertical HTLV-I infection in children breast-fed by seropositive mothers. *Journal of Infection* 46, 177-179.
- Andrade, R.G., de Cássia Gonçalves, P., Ribeiro, M.A., Romanelli, L.C.F., Ribas, J.G., Torres, E.B., de Freitas Carneiro-Proietti, A.B., Barbosa-Stancioli, E.F., Martins, M.L., 2013. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *Journal of Clinical Virology* 56, 135-140.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G., 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 19, 355-367.
- Arango, C., Concha, M., Zaninovic, V., Corral, R., Biojo, R., Borrero, I., Rodgers-Johnson, P., Mora, C., Garruto, R.M., Gibbs, C.J., 1988. Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Annals of neurology* 23.
- Araya, N., Sato, T., Ando, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Coler-Reilly, A., Yagishita, N., Yamauchi, J., Hasegawa, A., Kannagi, M., 2014. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+ CCR4+ T cells. *The Journal of clinical investigation* 124, 3431-3442.
- Araya, N., Sato, T., Yagishita, N., Ando, H., Utsunomiya, A., Jacobson, S., Yamano, Y., 2011. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Viruses* 3, 1532-1548.
- Arisawa, K., Soda, M., Endo, S., Kurokawa, K., Katamine, S., Shimokawa, I., Koba, T., Takahashi, T., Saito, H., Shirahama, S., 2000. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *International journal of cancer* 85, 319-324.
- Arnold, J., Zimmerman, B., Li, M., Lairmore, M.D., Green, P.L., 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112, 3788-3797.
- Bangham, C.R., 2009. CTL quality and the control of human retroviral infections. *European journal of immunology* 39, 1700-1712.
- Bangham, C.R., Araujo, A., Yamano, Y., Taylor, G.P., 2015a. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature reviews. Disease primers* 1, 15012.
- Bangham, C.R., Araujo, A., Yamano, Y., Taylor, G.P., 2015b. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature Reviews Disease Primers* 1, 15012.

- Bangham, C.R., Cook, L.B., Melamed, A., 2014. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Seminars in cancer biology*. Elsevier, pp. 89-98.
- Beavis, P.A., Stagg, J., Darcy, P.K., Smyth, M.J., 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology* 33, 231-237.
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2010. CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *immunity* 32, 129-140.
- Blas, M., Bravo, F., Castillo, W., Cairampoma, R., Cabrera, J., Gotuzzo, E., 2003. Sarna Noruega y paraparesia espástica tropical en pacientes infectados con HTLV-1. Reporte de 3 casos y discusión de la literatura. *Rev. Soc. Per. a Med. Inter* 16, 25.
- Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D.A., Jury, E.C., Mauri, C., 2012. Lipid-antigen presentation by CD1d<sup>+</sup> B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 36, 477-490.
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., Willems, L., 2008. The HTLV-1 tax interactome. *Retrovirology* 5, 76.
- Brito-Melo, G., Souza, J., Barbosa-Stancioli, E., Carneiro-Proietti, A., Catalan-Soares, B., Ribas, J., Thorum, G., Rocha, R., Martins-Filho, O., HTLV, G.I.d.P.e., 2004. Establishing phenotypic features associated with morbidity in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 11, 1105-1110.
- Carod-Artal, F., 2009. Inmunopatogénesis y tratamiento de la mielopatía asociada al virus linfotrópico humano de células T (HTLV-I). *Rev Neurol* 48, 147-155.
- Carpentier, A., Barez, P.-Y., Hamaidia, M., Gazon, H., De Brogniez, A., Perike, S., Gillet, N., Willems, L., 2015. Modes of human T cell leukemia virus type 1 transmission, replication and persistence. *Viruses* 7, 3603-3624.
- Carrascal, E., Cortés, A., Akiba, S., Tamayo, O., Quiñónez, F., Flórez, L., Piazuelo, M.B., 2004. Epidemiología y patología de la leucemia/linfoma de células T del adulto en Cali y el suroccidente colombiano. *Colombia Médica* 35.
- Cartier, L., 2009a. El HTLV-I Un virus que preocupa. *Revista chilena de neuro-psiquiatría* 47, 7-8.
- Cartier, L., 2009b. Paraparesia espástica progresiva asociada a HTLV-I en Chile: Estudio y seguimiento de 121 pacientes por diez años. *Revista chilena de neuro-psiquiatría* 47, 50-66.
- Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A.B.F., Da Fonseca, F., Correa-Oliveira, R., Peralva-Lima, D., Portela, R., Ribas, J., Goncalves, D., Proietti, F., Group, I.H.R., 2009. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. *Medical microbiology and immunology* 198, 1-3.
- Cook, L.B., Rowan, A.G., Melamed, A., Taylor, G.P., Bangham, C.R., 2012. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* 120, 3488-3490.
- Coutinho, R., Grassi, M.F.R., Korngold, A.B., Olavarria, V.N., Galvão-Castro, B., Mascarenhas, R.E., 2014. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. *BMC infectious diseases* 14, 453.
- Chaudhry, A., Rudensky, A.Y., 2013. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 123, 939.
- de Castro Costa, C.M., Zaninovic, V., De Carvalho, A., Santos, T., Shimokawa, H., Nogueira, T., Alcântara, R., Frota, C., 1997. Epidemiología y manifestaciones clínicas asociadas con el HTLV-I en Brasil. *Colombia Médica* 28, 113-115.
- Deschamps, R., Béra, O., Belrose, G., Lezin, A., Bellance, R., Signate, A., Cabre, P., Smadja, D., Césaire, R., Olindo, S., 2010. Absence of consistent association between human leukocyte antigen-I and-II alleles and human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis risk in an HTLV-1 French Afro-Caribbean population. *International Journal of Infectious Diseases* 14, e986-e990.

- Edlich, R., Hill, L.G., Williams, F.M., 2003. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. *Journal of long-term effects of medical implants* 13.
- Eguchi, K., Matsuoka, N., Ida, H., Nakashima, M., Sakai, M., Sakito, S., Kawakami, A., Terada, K., Shimada, H., Kawabe, Y., 1992. Primary Sjögren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Annals of the rheumatic diseases* 51, 769-776.
- Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2007. Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis. *The Journal of Immunology* 178, 7868-7878.
- Ferrando-Martínez, S., Ruiz-Mateos, E., Hernández, A., Gutiérrez, E., del Mar Rodríguez-Méndez, M., Ordoñez, A., Leal, M., 2011. Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age* 33, 197-207.
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., Mauri, C., 2013. CD19+ CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science translational medicine* 5, 173ra123-173ra123.
- Furuya, T., Nakamura, T., Fujimoto, T., Nakane, S., Kambara, C., Shirabe, S., Hamasaki, S., Motomura, M., Eguchi, K., 1999. Elevated levels of interleukin-12 and interferon-gamma in patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology* 95, 185-189.
- Fuzii, H.T., da Silva Dias, G.A., de Barros, R.J., Falcao, L.F., Quaresma, J.A., 2014. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Life sciences* 104, 9-14.
- Gadelha, S.R., Junior Alcântara, L.C., Costa, G.C., Acosta, A.X., Rios, D., Kashima, S., Covas, D.T., Galvão-Castro, B., 2008. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. *Journal of medical virology* 80, 2141-2146.
- Gao, Y., Lin, F., Su, J., Gao, Z., Li, Y., Yang, J., Deng, Z., Liu, B., Tsun, A., Li, B., 2012. Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3+ regulatory T cells. *Genes and immunity* 13, 1-13.
- Gessain, A., Cassar, O., 2012. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in microbiology* 3, 388.
- Gessain, A., Vernant, J., Maurs, L., Barin, F., Gout, O., Calender, A.d., De Thé, G., 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet* 326, 407-410.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fournau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of virology* 80, 6844-6854.
- Goon, P.K., Hanon, E., Igakura, T., Tanaka, Y., Weber, J.N., Taylor, G.P., Bangham, C.R., 2002. High frequencies of Th1-type CD4+ T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood* 99, 3335-3341.
- Greten, T.F., Slansky, J.E., Kubota, R., Soldan, S.S., Jaffee, E.M., Leist, T.P., Pardoll, D.M., Jacobson, S., Schneck, J.P., 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8+ T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7568-7573.
- Hanon, E., Goon, P., Taylor, G.P., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Weber, J.N., Bangham, C.R., 2001. High production of interferon  $\gamma$  but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 98, 721-726.
- Hanon, E., Hall, S., Taylor, G.P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J.N., Bangham, C.R., 2000. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95, 1386-1392.
- Hlela, C., Shepperd, S., Khumalo, N.P., Taylor, G.P., 2009. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *Aids Rev* 11, 205-214.

- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., Bangham, C.R., 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299, 1713-1716.
- Isa, A., Kasprócz, V., Norbeck, O., Loughry, A., Jeffery, K., Broliden, K., Klenerman, P., Tolfvenstam, T., Bowness, P., 2005. Prolonged activation of virus-specific CD8+ T cells after acute B19 infection. *PLoS medicine* 2, e343.
- Iwasaki, Y., 1993. Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. *Brain Pathology* 3, 1-10.
- Jacobson, S., 2002. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *Journal of Infectious Diseases* 186, S187-S192.
- Jacobson, S., Gupta, A., Mattson, D., Mingioli, E., McFarlin, D.E., 1990. Immunological studies in tropical spastic paraparesis. *Annals of neurology* 27, 149-156.
- Jeffery, K.J., Siddiqui, A.A., Bunce, M., Lloyd, A.L., Vine, A.M., Witkover, A.D., Izumo, S., Usuku, K., Welsh, K.I., Osame, M., 2000. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *The Journal of Immunology* 165, 7278-7284.
- Jeffery, K.J., Usuku, K., Hall, S.E., Matsumoto, W., Taylor, G.P., Procter, J., Bunce, M., Ogg, G.S., Welsh, K.I., Weber, J.N., 1999. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3848-3853.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., Ruscetti, F.W., 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of virology* 79, 12692-12702.
- Kaplan, J., Litchfield, B., Rouault, C., Lairmore, M.D., Luo, C.-C., Williams, L., Brew, B., Price, R., Janssen, R., Stoneburner, R., 1991. HTLV-I-associated myelopathy associated with blood transfusion in the United States Epidemiologic and molecular evidence linking donor and recipient. *Neurology* 41, 192-192.
- Kaplan, J.E., Osame, M., Kubota, H., Igata, A., Nishitani, H., Maeda, Y., Khabbaz, R.F., Janssen, R.S., 1990. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 3, 1096-1101.
- Kleinewietfeld, M., Hafler, D.A., 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews* 259, 231-244.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J.-I., Iwamasa, T., Goto, I., Yamamoto, N., 1993. In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-T Cells. *Virology* 196, 25-33.
- Kubota, R., Furukawa, Y., Izumo, S., Usuku, K., Osame, M., 2003. Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* 101, 3074-3081.
- Labalette, M., Salez, F., Pruvot, F., Noel, C., Dessaint, J., 1994. CD8 lymphocytosis in primary cytomegalovirus (CMV) infection of allograft recipients: expansion of an uncommon CD8+ CD57-subset and its progressive replacement by CD8+ CD57+ T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 95, 465-471.
- Le Priol, Y., Puthier, D., Lécureuil, C., Combadière, C., Debré, P., Nguyen, C., Combadière, B., 2006. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *The Journal of Immunology* 177, 5145-5154.
- Leal, F.E., Ndhlovu, L.C., Hasenkrug, A.M., Bruno, F.R., Carvalho, K.I., Wynn-Williams, H., Neto, W.K., Sanabani, S.S., Segurado, A.C., Nixon, D.F., 2013. Expansion in CD39+ CD4+ immunoregulatory t cells and rarity of Th17 cells in HTLV-1 infected patients is associated with neurological complications. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2028.



- Lima, M.A., Harab, R.C., Schor, D., Andrada-Serpa, M.J., Araújo, A.Q., 2007. Subacute progression of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of neurovirology* 13, 468-473.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56 dim CD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865-3874.
- MacNamara, A., Rowan, A., Hilburn, S., Kadolsky, U., Fujiwara, H., Suemori, K., Yasukawa, M., Taylor, G., Bangham, C.R., Asquith, B., 2010. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS pathogens* 6, e1001117.
- Maertens, G.N., Hare, S., Cherepanov, P., 2010. The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature* 468, 326-329.
- Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Fuller, S.D., Bangham, C.R., 2008. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS one* 3, e2251.
- Maloney, E.M., Cleghorn, F.R., Morgan, O.S.C., Rodgers-Johnson, P., Cranston, B., Jack, N., Blattner, W.A., Bartholomew, C., Manns, A., 1998. Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 17, 167-170.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., Battini, J.-L., 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115, 449-459.
- Manfras, B.J., Weidenbach, H., Beckh, K.-H., Kern, P., Möller, P., Adler, G., Mertens, T., Boehm, B.O., 2004. Oligoclonal CD8+ T-Cell Expansion in Patients with Chronic Hepatitis C Is Associated with Liver Pathology and Poor Response to Interferon- $\alpha$  Therapy. *Journal of clinical immunology* 24, 258-271.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. B cell regulation of CD4+ CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 178, 3447-3456.
- Martin, F., Fedina, A., Youshya, S., Taylor, G.P., 2010. A 15-year prospective longitudinal study of disease progression in patients with HTLV-1 associated myelopathy in the UK. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, jnnp. 2009.191239.
- Martínez-Nieto, O., Isaza-Ruget, M., Rangel-Espinosa, N., Morales-Reyes, O.L., 2007. Seroprevalencia de Anticuerpos para Virus Linfotrópicos Humanos (HTLV I/II) en donantes de sangre de una Clínica de Bogotá, Colombia. 1999-2004. *Rev salud pública* 9, 253-261.
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., 2014. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41, 1040-1051.
- Mauri, C., Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology* 30, 221-241.
- Mavropoulos, A., Varna, A., Zafiriou, E., Liaskos, C., Alexiou, I., Roussaki-Schulze, A., Vlychou, M., Katsiari, C., Bogdanos, D.P., Sakkas, L.I., 2017. IL-10 producing Bregs are impaired in psoriatic arthritis and psoriasis and inversely correlate with IL-17-and IFN $\gamma$ -producing T cells. *Clinical Immunology* 184, 33-41.
- Medina, E.A., Orduz, R., Morales, O.L., Martínez, Ó., Baldión, M., Isaza, M.A., 2013. Leucemia/linfoma T del adulto en pacientes infectados con HTLV-1: reporte de dos casos de Colombia. *Biomédica* 33, 519-525.
- Mendoza-Suárez, G.E., 2011. Paraparesia espástica tropical asociada a virus linfotrófico de las células T humanas tipo 1: consideraciones clínico epidemiológicas 1988-2008. *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*, 170-176.

- Michaëlsson, J., Barbosa, H.M.R., Jordan, K.A., Chapman, J.M., Brunialti, M.K., Neto, W.K., Nukui, Y., Sabino, E.C., Chieia, M.A., Oliveira, A.S.B., 2008. The frequency of CD127 low expressing CD4+ CD25 high T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC immunology* 9, 41.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., Bhan, A.K., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16, 219-230.
- Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Yoshimura, K., Nakashima, S., Shirao, M., Araki, S., Takatsuki, K., Mori, S., Miyata, N., 1992. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *American journal of ophthalmology* 114, 123-129.
- Montanheiro, P., Penalva de Oliveira, A., Smid, J., Fukumori, L., Olah, I., Duarte, A.d.S., Casseb, J., 2009. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scandinavian journal of immunology* 70, 403-407.
- Morgan, O.S., Mora, C., Rodgers-Johnson, P., Char, G., 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *The Lancet* 334, 1184-1187.
- Moritoyo, T., Izumo, S., Moritoyo, H., Tanaka, Y., Kiyomatsu, Y., Nagai, M., Usuku, K., Sorimachi, M., Osame, M., 1999. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of neurovirology* 5, 241-248.
- Murphy, E., Figueroa, P., Gibbs, W.N., Holding-Cobham, M., Cranston, B., Malley, K., Bodner, A.J., Alexander, S.S., Blattner, W.A., 1991. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica: I. Demographic determinants. *American journal of epidemiology* 133, 1114-1124.
- Murphy, E., Friley, J., Smith, J., Engstrom, J., Sacher, R., Miller, K., Gible, J., Stevens, J., Thomson, R., Hansma, D., 1997. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. *Neurology* 48, 315-320.
- Nagai, M., Kubota, R., Greten, T.F., Schneck, J.P., Leist, T.P., Jacobson, S., 2001. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *The Journal of infectious diseases* 183, 197-205.
- Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C.R., Izumo, S., 1998. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of neurovirology* 4, 586-593.
- Nejmeddine, M., Negi, V.S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G.P., Bangham, C.R., 2009. HTLV-1–Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114, 1016-1025.
- Nishioka, K., Maruyama, I., Sato, K., Kitajima, I., Nakajima, Y., Osame, M., 1989. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *The Lancet* 333, 441.
- Ochi, H., Wu, X.-M., Osoegawa, M., Horiuchi, I., Minohara, M., Murai, H., Ohyagi, Y., Furuya, H., Kira, J.-i., 2001. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *Journal of neuroimmunology* 119, 297-305.
- Oh, U., Jacobson, S., 2008. Treatment of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: toward rational targeted therapy. *Neurologic clinics* 26, 781-797.
- Olindo, S., Cabre, P., Lézin, A., Merle, H., Saint-Vil, M., Signate, A., Bonnan, M., Chalon, A., Magnani, L., Cesaire, R., 2006. Natural History of Human T-Lymphotropic Virus 1–Associated Myelopathy: A 14-Year Follow-up Study. *Archives of neurology* 63, 1560-1566.

- Orland, J., Engstrom, J., Fridey, J., Sacher, R., Smith, J., Nass, C., Garratty, G., Newman, B., Smith, D., Wang, B., 2003. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* 61, 1588-1594.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., Tara, M., 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *The Lancet* 327, 1031-1032.
- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., Thoulouze, M.-I., 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine* 16, 83-89.
- Pereira, L.M.S., Gomes, S.T.M., Ishak, R., Vallinoto, A.C.R., 2017. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. *Frontiers in immunology* 8, 605.
- Petrova, M., Muhtarova, M., Nikolova, M., Magaev, S., Taskov, H., Nikolovska, D., Krastev, Z., 2006. Chronic Epstein-Barr virus-related hepatitis in immunocompetent patients. *World journal of gastroenterology: WJG* 12, 5711.
- Pías-Peleteiro, L., Pías-Peleteiro, J.M., Arias, M., 2015. Paraparesia espástica tropical en una región no tropical. *Rev Neurol* 61, 357-362.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C., 1980. 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* 77, 7415-7419.
- Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Soares, B.C., Murphy, E.L., 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058-6068.
- Reid, R., Lindholm, P., Mireskandari, A., Dittmer, J., Brady, J., 1993. Stabilization of wild-type p53 in human T-lymphocytes transformed by HTLV-I. *Oncogene* 8, 3029-3036.
- Román, G.C., 1988. The neuroepidemiology of tropical spastic paraparesis. *Annals of neurology* 23.
- Romanelli, L.C.F., Caramelli, P., Martins, M.L., Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Carneiro-Proietti, A.B.d.F., 2013. Incidence of human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a long-term prospective cohort study of initially asymptomatic individuals in Brazil. *AIDS research and human retroviruses* 29, 1199-1202.
- Rosser, E.C., Mauri, C., 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42, 607-612.
- Sabouri, A.H., Saito, M., Lloyd, A.L., Vine, A.M., Witkover, A.W., Furukawa, Y., Izumo, S., Arimura, K., Marshall, S.E., Usuku, K., 2004. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *The Journal of infectious diseases* 190, 1279-1285.
- Salcedo-Cifuentes, M., Domínguez, M.C., García-Vallejo, F., 2011. Epidemiología genómica y paraparesia espástica tropical asociada a la infección por el virus linfotrópico humano de células T tipo 1.
- Salgado, F.J., Lojo, J., Fernández-Alonso, C.M., Viñuela, J.E., Cordero, O.J., Nogueira, M., 2002. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunology and cell biology* 80, 138.
- Santos, S.B., Porto, A.F., Muniz, A.L., De Jesus, A.R., Magalhães, E., Melo, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Carvalho, E.M., 2004. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC infectious diseases* 4, 7.
- Satou, Y., Yasunaga, J.-i., Yoshida, M., Matsuoka, M., 2006. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 720-725.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366.

- Shin, H.-J., Lee, J.-B., Park, S.-H., Chang, J., Lee, C.-W., 2009. T-bet expression is regulated by EGR1-mediated signaling in activated T cells. *Clinical immunology* 131, 385-394.
- Siachoque, H., Satisteban, N., Iglesias-Gamarra, A., 2011. Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología* 18, 203-220.
- Solarte, F.R., Castañeda, C.A., Solarte, M.R., Zuluaga, D.L.O., Solarte, A.R., 2011. Paraparesia espástica tropical en un paciente con HTLV-I. *Neurología Argentina* 3, 229-233.
- Staun-Ram, E., Miller, A., 2017. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clinical Immunology* 184, 11-25.
- Strioga, M., Pasukoniene, V., Characiejus, D., 2011. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 134, 17-32.
- Sun, C.-M., Deriaud, E., Leclerc, C., Lo-Man, R., 2005. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 22, 467-477.
- Takachi, T., Takahashi, M., Takahashi-Yoshita, M., Higuchi, M., Obata, M., Mishima, Y., Okuda, S., Tanaka, Y., Matsuoka, M., Saitoh, A., 2015. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. *Cancer science* 106, 461-465.
- Taylor, G.P., Tosswill, J.H., Matutes, E., Daenke, S., Hall, S., Bain, B.J., Davis, R., Thomas, D., Rossor, M., Bangham, C.R., 1999. Prospective study of HTLV-I infection in an initially asymptomatic cohort. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 22, 92-100.
- Tebbe, B., Wilde, B., Ye, Z., Wang, J., Wang, X., Jian, F., Dolff, S., Schedlowski, M., Hoyer, P.F., Kribben, A., 2016. Renal transplant recipients treated with calcineurin-inhibitors lack circulating immature transitional CD19+ CD24hiCD38hi regulatory B-lymphocytes. *PloS one* 11, e0153170.
- Thompson, C., Powrie, F., 2004. Regulatory T cells. *Current opinion in pharmacology* 4, 408-414.
- Toro, C., Rodés, B., Poveda, E., Soriano, V., 2003. Rapid development of subacute myelopathy in three organ transplant recipients after transmission of human T-cell lymphotropic virus type I from a single donor. *Transplantation* 75, 102-104.
- Toulza, F., Heaps, A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Bangham, C.R., 2008. High frequency of CD4+ FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood* 111, 5047-5053.
- Toulza, F., Nosaka, K., Tanaka, Y., Schioppa, T., Balkwill, F., Taylor, G.P., Bangham, C.R., 2010. Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 185, 183-189.
- Trapani, J.A., Smyth, M.J., 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* 2, 735-747.
- Treviño, A., Vicario, J.L., Lopez, M., Parra, P., Benito, R., De Lejarazu, R.O., Ramos, J.M., Del Romero, J., de Mendoza, C., Soriano, V., 2013. Association between HLA alleles and HAM/TSP in individuals infected with HTLV-1. *Journal of neurology* 260, 2551-2555.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., Uchino, H., 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481-492.
- Umehara, F., Nakamura, A., Izumo, S., Kubota, R., Ijichi, S., Kashio, N., Hashimoto, K.-I., Usuku, K., Sato, E., Osame, M., 1994. Apoptosis of T lymphocytes in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy: a possible mechanism to control viral infection in the central nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 53, 617-624.
- Ureta-Vidal, A., Pique, C., Garcia, Z., Dehée, A., Tortevoeye, P., Désiré, N., Gessain, A., Chancerel, B., Gout, O., Lemonnier, F.A., 2001. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection induces greater expansions of CD8 T lymphocytes in persons with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis than in asymptomatic carriers. *The Journal of infectious diseases* 183, 857-864.

- Vallejo, F.G., 2006. Caracterización molecular y genómica del proceso de integración de provirus del virus linfotrópico humano (HTLV) tipo I. *Revista de la Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales* 30, 155.
- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., Akdis, M., 2013. IgG 4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 1204-1212.
- Vasquez, P., Sanchez, G., Volante, C., Vera, L., Ramirez, E., Soto, G., Lee, H., 1991. Human T-lymphotropic virus type I: new risk for Chilean population. *Blood* 78, 850-851.
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., Gotuzzo, E., 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet infectious diseases* 7, 266-281.
- Vine, A.M., Witkover, A.D., Lloyd, A.L., Jeffery, K.J., Siddiqui, A., Marshall, S.E., Bunce, M., Eiraku, N., Izumo, S., Usuku, K., 2002. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of infectious diseases* 186, 932-939.
- Woodland, D.L., Dutton, R.W., 2003. Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Current opinion in immunology* 15, 336-342.
- Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., Yagishita, N., 2009. Abnormally high levels of virus-infected IFN- $\gamma$ + CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PloS one* 4, e6517.
- Yamano, Y., Coler-Reilly, A., 2017. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+ CCR4+ T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. *Journal of neuroimmunology* 304, 51-55.
- Yamano, Y., Sato, T., 2012. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Frontiers in microbiology* 3.
- Yamano, Y., Takenouchi, N., Li, H.-C., Tomaru, U., Yao, K., Grant, C.W., Maric, D.A., Jacobson, S., 2005. Virus-induced dysfunction of CD4+ CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1361.
- Yeung, M.L., Yasunaga, J.-i., Bennasser, Y., Duseti, N., Harris, D., Ahmad, N., Matsuoka, M., Jeang, K.-T., 2008. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer research* 68, 8976-8985.
- Yoshizaki, A., Miyagaki, T., DiLillo, D.J., Matsushita, T., Horikawa, M., Kountikov, E.I., Spolski, R., Poe, J.C., Leonard, W.J., Tedder, T.F., 2012. Regulatory B cells control T cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491, 264.
- Zhang, B., Chikuma, S., Hori, S., Fagarasan, S., Honjo, T., 2016. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 8490-8495.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A. Consentimiento informado**

#### **INFORMACIÓN PARA PACIENTES Y FORMATO DE CONSENTIMIENTO**

##### **Introducción**

Investigadores del Grupo de Inmunología y Enfermedades Infecciosas y del Departamento de Patología de la Universidad del Cauca están realizando un estudio para evaluar algunas moléculas y tipos de células que se producen durante la infección por el virus HTLV-1 y que podrían estar participando del desarrollo de paraparesia espástica tropical asociada al virus HTLV-1. Este estudio está apoyado por la Universidad del Cauca y será realizado en el Grupo de Inmunología y Enfermedades Infecciosas – Departamento de Patología de esta misma universidad

##### **Porque lo estamos invitando a participar**

Lo estamos invitando a participar en este estudio porque usted ha sido diagnosticado con paraparesia espástica tropical o tiene un resultado positivo que demuestra la infección por HTLV-1.

##### **Propósito**

El propósito de este estudio es evaluar algunas moléculas y tipos de células que se producen durante la infección por el virus HTLV-1 y que podrían estar participando del desarrollo de paraparesia espástica tropical asociada al virus HTLV-1.

##### **Participación**

Usted es libre de participar o no en el estudio. Si usted decide no participar, no habrá discriminación alguna para usted y no se verá afectada la atención médica que usted recibe como tratamiento de la enfermedad que padece. Si usted decide participar, le pediremos hacer lo siguiente:

- Responder algunas preguntas relacionadas con su historia médica, su ocupación, sus hábitos, el diagnóstico de su enfermedad, el tiempo de evolución, etc.
- Autorizar que le tomen una muestra de sangre, de acuerdo al estado general que usted presente, de máximo 15ml.
- Acceder a que se realice un examen físico completo por parte de los investigadores y que nos permita acceder a su historia clínica.

Las muestras obtenidas solo podrán ser usadas para este estudio que se desarrollará en el Laboratorio de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca

y no podrán ser usadas para posteriores estudios. Sus muestras no serán enviadas fuera del país y no serán sometidos a manipulación genética ni procedimientos fuera de la ley y no considerados dentro del estudio.

### **Costos**

No se le cobrará ningún dinero por participar en este estudio. Los costos del procesamiento de las muestras de sangre para los análisis mencionados en el proyecto serán cubiertos por el estudio.

### **Beneficios**

Usted no recibirá ningún beneficio a corto plazo; sin embargo, el estudio podría ayudar a aclarar lo que ocurre en esta enfermedad y por lo tanto ser de utilidad a personas que en el futuro la presenten.

### **Riesgos**

La toma de las muestras de sangre puede doler un poco. Puede salirle un morado, sangrar o, raras veces infectarse en donde se hizo el procedimiento. Limpiaremos la piel donde se colocará la aguja para tomar la sangre. Esto disminuye el riesgo de infección. La cantidad total de sangre que tomaremos (máximo 15mL) equivale a menos de una cucharada. El riesgo para la salud que conlleva la obtención de esta cantidad de sangre, no es distinto al riesgo de obtener una muestra de sangre para cualquier otro tipo de examen. Si usted necesita tratamiento como resultado de su participación en el estudio, usted no tendrá que pagar por él.

### **Derechos**

Usted es libre de rehusar a participar en el estudio ahora o retirarse en una fecha posterior, sin afectar los servicios médicos que usted recibe o a los cuales usted tendría derecho.

### **Confidencialidad**

Guardaremos privacidad acerca de los registros y/o resultados que puedan identificarlo a usted hasta donde nos lo permita la ley. Ni sus registros ni sus muestras serán marcados con su nombre y solo serán identificadas con un código del estudio. Los investigadores que participen en este estudio podrán ver ese código pero no su nombre. Su nombre tampoco aparecerá en ningún informe de este estudio. Toda la información

que se origine a partir de este estudio será mantenida bajo llave (hasta por 10 años) y solo los investigadores del proyecto podrán acceder a ella.

### **Compensación**

Usted no recibirá compensación económica (dinero) por participar en este estudio.

### **Obligaciones**

Su participación en el proyecto es únicamente en la toma de muestra y en ayudarnos a completar una encuesta que le hará uno de los investigadores. Dado que el procedimiento de la toma de la muestra de sangre representa un riesgo mínimo para su salud, no requiere de seguimiento alguno, a menos que se presente algún problema de salud relacionado con la extracción de la sangre.

### **Divulgación**

Los resultados de este estudio serán socializados en eventos académicos relacionados con el tema y serán además sometidos para publicación en una revista relacionada con el tema.

### *Personas a contactar*

Si tiene preguntas adicionales o alguna queja con respecto al estudio puede hacérselas a Nancy D Marín A y Julio C Klinger en el Grupo de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca (teléfono 8209875).

### **Aceptación**

Certifico que he leído y entendido los términos del presente consentimiento y acepto, de manera voluntaria, participar en él haciendo una donación de 3 ml de sangre y permitiendo el acceso a la biopsia que ya me fue tomada.



**PARTICIPANTE (MI HUELLA DACTILAR FRENTE A MIS DATOS):**

Mi nombre: \_\_\_\_\_

Mi cédula de ciudadanía: \_\_\_\_\_

Mi dirección permanente: \_\_\_\_\_

Mis teléfonos, para contactarme: \_\_\_\_\_

Mi correo electrónico: \_\_\_\_\_

**TESTIGO :**

Observé el proceso de consentimiento. El potencial participante leyó este formato (o le ha sido leído), tuvo oportunidad de hacer preguntas, estuvo conforme con las respuestas y firmó (o colocó su huella digital) para ingresar al estudio.

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Cédula de ciudadanía: \_\_\_\_\_

Dirección permanente: \_\_\_\_\_

Teléfonos, para contactarme: \_\_\_\_\_

Correo electrónico: \_\_\_\_\_

**Una Copia de este documento le será entregado a usted.**

## ANEXO B. Formato de encuesta

### INFORMACIÓN DE PACIENTES EN LAS INVESTIGACIONES

Fecha \_\_\_\_\_ Lugar y fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

Edad (años) \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Documento de identidad \_\_\_\_\_

Grupo sanguíneo \_\_\_\_\_ Afiliación a salud \_\_\_\_\_ Teléfono \_\_\_\_\_

Dirección de residencia  
actual \_\_\_\_\_

Correo electrónico \_\_\_\_\_

En qué lugares ha habitado anteriormente  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_ Estrato socioeconómico \_\_\_\_\_

Estado civil: Soltero \_\_\_\_\_ Unión estable \_\_\_\_\_ Otro \_\_\_\_\_

Escolaridad: Ninguna \_\_\_\_\_ Primaria \_\_\_\_\_ Secundaria \_\_\_\_\_ Técnica \_\_\_\_\_ Universitaria \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES MÉDICOS

#### ANTECEDENTES FAMILIARES:

Algún familiar cercano (padres, hermanos, tíos, primos) ha sufrido alguna enfermedad:

De la cabeza o los nervios Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Del corazón o presión alta Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Del pulmón Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Del estómago o intestino Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

De los riñones Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Cáncer Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES PERSONALES:

Antecedente de Lactancia Materna Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Fuma Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Cuántos por semana? \_\_\_\_\_

Consume alcohol Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Cuánto por semana? \_\_\_\_\_

Consume sustancias alucinógenas? \_\_\_\_\_ Cuáles \_\_\_\_\_ Cuánto por semana \_\_\_\_\_

Ha donado sangre anteriormente Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Hace cuánto \_\_\_\_\_

Convive con animales? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Cuáles \_\_\_\_\_

Ha estado expuesto a tóxicos (fumigantes, metales pesados) Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_\_,  
Cuáles \_\_\_\_\_

Ha estado hospitalizado, bajo tratamiento médico o le han realizado alguna cirugía?  
Cuál?

Cuándo? \_\_\_\_\_  
Alguna vez ha recibido transfusión sanguínea, trasplante de órganos, tejidos u hormona  
del crecimiento? Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Hace  
cuánto? \_\_\_\_\_

En el último mes, ha tomado algún medicamento Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_ Cuál

Se ha sentido bien de salud en las últimas dos semanas? Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
Las siguientes preguntas tienen que ver con su historia sexual. Por favor, siéntase libre  
de no responder si no se siente cómodo:  
Edad de inicio de relaciones sexuales \_\_\_\_\_

### HALLAZGOS POSITIVOS AL EXÁMEN FÍSICO GENERAL:

Peso: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_ TA: \_\_\_\_\_  
FR: \_\_\_\_\_ Temperatura: \_\_\_\_\_

### HALLAZGOS POSITIVOS AL EXÁMEN NEUROLÓGICO:

Fuerza \_\_\_\_\_  
Sensibilidad superficial \_\_\_\_\_  
Sensibilidad profunda \_\_\_\_\_  
Tono muscular \_\_\_\_\_ Trofismo \_\_\_\_\_  
Reflejos osteotendinosos \_\_\_\_\_  
Signos cerebelosos \_\_\_\_\_

Pares craneanos : I \_\_\_\_\_ II \_\_\_\_\_ III \_\_\_\_\_  
IV \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ VI \_\_\_\_\_  
VII \_\_\_\_\_  
VIII \_\_\_\_\_ IX \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_  
XI \_\_\_\_\_ XII \_\_\_\_\_  
Signos meníngeos \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nombre del Investigador(es) que realizó la encuesta  
1. \_\_\_\_\_  
2. \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Ciudad y lugar: \_\_\_\_\_

## ANEXO C. PROTOCOLO HTLV-1 INTEGRADO

1. Los materiales, equipos y reactivos se representan en la tabla 0.1

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS	
		Soluciones	Marcadores
tubos falcón de 15 ml	Pipeta 1000 ul	PBS 1X	CD4 PECy5
tubos falcón de 50 ml	Pipeta 200ul	Azul de tripano	CD4 FITC
tubos de centrifuga	Pipeta 10 ul	PMA a una concentración final de 40ng/ml	CD25 PECy5
pipetas Pasteur	Centrifuga refrigerada	Ionicina concentración final 1ug/ml	CD8 PECy5
Puntas para pipeta de 10 ul, 200 ul y 1000 ul	Microscopio	Suero 2%	DP1 APC
Gradilla para tubos	Cámara de Neubauer	Paraformaldehido 4%	CD73 PE
Tubos eppendorf	incubadora	Medio RPMI	FOX P3 PE
Plato de cultivo	cámara de flujo laminar	Ficoll	INF- y FITC
		Brefeldina concentración final 10ug/ml	IL-4 PE
		H <sub>2</sub> O	CD19 PE
		Buffer permeabilizante ebroscreenee	CD38 PECy5
			CD24 ALEXA FLUOR 647
			HLA-DR PE
			CD8 PECy5
			CD57 PE

**Tabla 0.1**

2. CONDICIONES Y CANTIDADES DE MARCADORES Las condiciones para cada tubo se observan en la tabla 1.

CONDICIONES					
CITOQUINAS	<b>1</b> Células	<b>2</b> CD4 PECy5 (3ul)	<b>3</b> CD8 PECy5 (3ul)	<b>4</b> CD4 PECy5 (3ul) + INF-γ FITC (3ul) + IL-4 PE (5ul)	<b>5</b> CD8 PECy5 (3ul) + INF-γ FITC (3ul) + IL-4 PE (5ul)
T REGULADORAS Treg	<b>6</b> CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)	<b>7</b> CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)+ FOX P3 PE (4ul)	<b>8</b> CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)+ CD73 PE (3ul) + DPI APC (3ul)		
B REGULADORAS Breg	<b>9</b> células	<b>10</b> CD19 PE (5ul) + CD38 PECy5 (3ul) + CD24 ALEXA FLUOR 647 (3ul)			
T ACTIVACION	<b>11</b> CD4 FITC (5ul) + HLADR PE (5ul) + CD8 PECy5 (3ul)				
	<b>12</b> CD4 FITC (5ul) + CD57 PE (5ul) + CD8 PECy5 (3ul)				

Tabla 1.

### DÍA 1.

1. Marcar los tubos respectivos
2. Extracción mononuclear
  - 2.1 Tomar la muestra en un tubo con heparina (+ - 7ml sangre).
  - 2.2 Diluir la sangre con PBS 1X (1:1) en tubo de falcón de 50mL.
  - 2.3 En un tubo falcón de 15ml, adicionar 3ml de ficoll y 7ml de sangre + PBS (dilución del paso 2). \* verter la sangre lentamente con una pipeta pasteur manteniendo el tubo inclinado

2.4 Centrifugar 30 minutos, temperatura ambiente, 2500 rpm \*frenar lento

2.5 Con pipeta pasteur, retirar la capa de mononucleares y depositarla en un tubo falcón d 15 ml

2.6 Lavar dos veces. \*antes de lavar re suspender 2.6.1 Lavar 5 minutos, temperatura ambiente, 1500 rpm, 10ml PBS

2.6.2 Lavar 5 minutos, 4°C, 1500 rpm, 10ml PBS \*reconstituir el medio RPMI con suero al 5% \*realizar esta solución mientras se realizan los lavados del paso

2.6 3. Dejar las células en medio (6 ml) a 4°C hasta el día 2. \*la viabilidad celular aproximada de 48 horas. Reconstituir el medio RPMI con suero al 5% \*realizar esta solución mientras se realizan los lavados del paso

2.6 3.1 Reconstituir ionomicina y PMA teniendo en cuenta las condiciones de la tabla 2.

Solución	Concentración inicial	Concentración Solución intermedia		Concentración final
ionomicina	10 mg/ml	100ug/ml		1ug/ml
PMA	25mg/ml	500ug/ml	10ug/ml	40ng/ml

Tabla 2.

## DÍA 2

### 4. CONTEO DE VIABILIDAD CELULAR

4.1 Agregar 90ul azul de tripano y 10 ul de células (10:1) \*si es necesario diluir (5:1)

4.2 Contar en la cámara de Neubauer (10 ul de la solución 6.1)

4.3 Determinar el número de células por ml

4.3.1 # células totales en los 4 cuadrantes x factor de dilución x 10.000/4

### 5. CITOQUINAS

5.1 para cada tubo debemos dejar  $1 \times 10^6$  células en 500µl de medio de estímulo (PMA e Ionomicina)

5.2, incubar 1 hora a 37°C 5.3 Reconstituir brefeldina teniendo en cuenta las condiciones de la tabla 3.

solución	Concentración inicial	concentración Solución intermedia	Concentración final
Brefeldina	10mg/ml	200 ug/ml	10 ug/ml

Tabla 3.

5.4 adicionar brefeldina a cada tubo, incubar 4 horas a 37°C

5.5 Lavar 5 minutos, 4°C, 1500 rpm, 1ml PBS 1X \*descartar sobrenadante PARA TODOS LOS TUBOS

6. preparar solución bloqueo 2% (PBS + suero 2%) . a. agregar 200 ul de solución bloqueo a cada tubo durante 15 minutos, a 4°C

7. Agregar 500 ul PBS, 5 minutos, 4°C, 1500 rpm \*descartar sobrenadante

8. adicionar 100 ul de PBS 1X + anticuerpos teniendo en cuenta las cantidades y condiciones descritas en la tabla 1. Durante 30 minutos a 4°C.

9. Agregar 500 ul PBS 1X , 5 minutos, 4°C, 1500 rpm \*descartar sobrenadante

10. FIJACION 10.1 A todos los tubos adicionar 200ul de PBS+ 200ul de paraformaldehido durante 15 minutos a 4°C.

10.2 lavar dos veces (agregar 500 ul PBS, 5 minutos, 4°C, 1500 rpm \*descartar sobrenadante)

11. PERMEABILIZACIÓN PARA LOS TUBOS 4, 5 Y 7

4: células + CD4 PECy5(3ul) + IL-4 PE (5ul) + IFN FITC(3ul)

5: Células + CD8 PECy5(3ul) + IL-4 PE (5ul) + IFN FITC(3ul)

7: células + CD4 FITC (5ul) + CD25 PECy5(5ul) + FOX P3 PE(3ul)

11.1 preparar solución permeabilizante (buffer permeabilizante + H 2O, proporción 1:9) \*preparar solución permeabilizante únicamente antes de adicionar

11.2 Adicionar 300 ul de permeabilizaste y lavar 5 minutos, 4°C, 1500 rpm \*descartar sobrenadante

11.3 Adicionar 100 ul de permeabilizaste a los tubos 4, 5 y 7 y agregar las respectivas cantidades de anticuerpo descritas en la tabla 1., 1 hora y 30 minutos a 4°C y oscuridad

12. Transcurrida el tiempo, los tubos permeabilizados se deben lavar 5 minutos, 4°C, 1500 rpm, 1 ml PBS \*descartar sobrenadante



13. adicionar 200ul de PBS a los tubos y dejar a 4°C hasta lectura en el clitómetro. NO PERMEABILIZADOS

14. adicionar 200ul de PBS a los tubos no permeabilizados indicados por la numeración y dejar a 4°C hasta realizar la lectura en el clitómetro.

**DIA 3.**

15. Lectura en el clitómetro de flujo en el orden indicado en la tabla 1.

CONDICIONES PANEL DE CITOMETRIA					
CITOQUINAS	1	2	3	4	5
	Células	CD4 PECy5 (3ul)	CD8 PECy5 (3ul)	CD4 PECy5 (3ul) + INF-γ FITC (3ul) + IL-4 PE (5ul)	CD8 PECy5 (3ul) + INF-γ FITC (3ul) + IL-4 PE (5ul)
T REGULADORAS (Treg)	CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)	CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)+ FOX P3 PE (4ul)	CD4 FITC (5ul)+ CD25 PECy5 (5ul)+ CD73 PE (3ul) + DPI APC (3ul)		
B REGULADORAS (Breg)	9 CD19 PE (5ul) + CD38 PECy5 (3ul) + CD24 ALEXA FLUOR 647 (3ul)				
T ACTIVACION	10 CD4 FITC (5ul) + HLADR PE (5ul) + CD8 PECy5 (3ul)				
	11 CD4 FITC (5ul) + CD57 PE (5ul) + CD8 PECy5 (3ul)				

Tabla 1.

**ANEXO D.** Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con PET/HAM positivos y PET/HAM negativos.

		<b>PET/HAM POSITIVOS</b>	<b>PET/HAM NEGATIVOS</b>
		<b>(n=9) n (%)</b>	<b>(n=10) n (%)</b>
<b>MASCULINOS</b>		5 (55.6)	5 (50)
<b>FEMENINOS</b>		4 (44.4)	5 (50)
<b>MEDIANA DE EDAD Y RANGO</b>		58.8 (32-79)	62 (27-80)
<b>RESIDENCIA</b>	<b>URBANA</b>	4 (44.4)	6 (60)
	<b>RURAL</b>	5 (55.6)	4 (40)
<b>* ICM (KG/M2)</b>	<b>NORMAL</b>	6 (66.7)	8 (80)
	<b>BAJO PESO</b>	0 (0)	0 (0)
	<b>SOBREPESO</b>	3 (33.3)	2 (20)
	<b>OBESIDAD</b>	0 (0)	0 (0)
<b>ANT LACTANCIA MATERNA</b>		4 (44.4)	1 (100)
<b>USO DE DROGAS IV</b>		0 (0)	0(0)
<b>ANTEC. DONACIÓN SANGRE</b>		3 (33.3)	1 (100)
<b>ACTIVIDAD HOMOSEXUAL</b>		0 (0)	0 (0)
<b>ANTEC. TRANSFUSIÓN</b>		6 (75)	2 (20)
<b>SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS</b>	<b>PARAPARESIA ESPÁSTICA MI</b>	5 (55.6)	7 (70)
	<b>PARESTESIAS MI **</b>	5 (55.6)	1 (10)
	<b>ALTERACIONES EN MARCHA</b>	5 (55.6)	4 (40)
	<b>SIGNO DE BABINSKI</b>	6 (66.6)	6 (60)
	<b>NORMOTONIA MI</b>	2 (22.2)	2 (20)
	<b>HIPERTONÍA MI</b>	1 (11.1)	7 (70)
	<b>HIPOTONÍA MI</b>	5 (55.6)	1 (10)
	<b>HIPORREFLEXIA MI</b>	1 (11.1)	4 (40)
	<b>HIPERREFLEXIA MI CON O SIN CLONUS</b>	6 (66.6)	6 (60)
	<b>SIGNOS CEREBELOS</b>	2 (22.2)	1 (10)
	<b>ALT PARES CRANEALES</b>	1 (11.1)	2 (20)
<b>SÍNTOMAS UROLÓGICOS</b>	<b>INCONTINENCIA</b>	5 (55.6)	3 (30)
	<b>DISFUNCIÓN ERÉCTIL</b>	3 (33.3)	1 (10)

\*ICM: índice de masa corporal; \*\*MI: miembros inferiores

