

Sección: Artículos originales

Inmunogenicidad diferencial de dominios de las glicoproteínas de la envoltura del HTLV-IFelipe García Vallejo, Ph.D.¹, Norman Balcázar Morales, M.Sc.²

RESUMEN

Mediante inmunoblot se evaluó la reactividad de las glicoproteínas en diferentes regiones de la envoltura viral de anticuerpos presentes en el suero de individuos seropositivos para HTLV-I provenientes del municipio de Tumaco. Se determinó que la porción carboxilo-terminal de la gp-46 es la más inmunodominante (aminoácidos 166-308), pues presentó cifras variables de reactividad de 80% a 100%. Esta región podría ser una candidata potencial para desarrollar una vacuna con espectro amplio a nivel mundial. Además, la región comprendida entre los aminoácidos 166-201 de la gp-46 del HTLV-I se reconoció en 100% de los sueros provenientes de individuos con PET/HAM (paraparesia espástica tropical/mielopatía asociada con la infección por HTLV-I) y sólo en 80% de portadores sanos ($p = 0.004$), diferencia que es estadísticamente significativa. Este resultado permitió proponer que durante la progresión de la enfermedad se presentarían cambios funcionales en determinadas porciones de la proteína de superficie de la envoltura, que de algún modo modula la respuesta inmune humoral del individuo seropositivo para HTLV-I.

Palabras claves: Glicoproteínas. HTLV-I. Retrovirus. Infección viral.

El virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I), es un retrovirus del grupo HTLV-BLV perteneciente a la familia Retroviridae¹. Es el agente etiológico de la leucemia/linfoma de las células T del adulto (ATL)² y de la mielopatía asociadas con el HTLV-I (MAH)/paraparesia espástica tropical (PET)^{3,4}. Como algunas otras infecciones de tipo viral, el HTLV-I se transmite por las vías perinatal, sexual o sanguínea. Sin embargo, la historia natural de la infección no se entiende muy bien. La epidemiología de la infección en sí misma es altamente rara, pues está marcada por la restricción geográfica y un alto grado de microepidemicidad⁵.

En Colombia los primeros casos de PET los informaron Zaninovic *et al.*⁶ y Arango *et al.*⁷ publicaron su asociación con el HTLV-I poco después del informe de Gessain *et al.*³ El

foco de mayor endemia en Colombia se encuentra en Tumaco, donde la prevalencia alcanza 0.098%⁸; sin embargo ha sido posible identificar focos aislados en toda la Costa del Pacífico, donde el virus infecta individuos de otras etnias⁹. Las glicoproteínas de la envoltura de retrovirus tanto de humanos como de animales, son esenciales en los estadios iniciales de la infección viral. Potencialmente son las proteínas más inmunogénicas de todos los antígenos virales¹⁰.

El gen ENV del HTLV-I codifica por una glicoproteína de 62 Kd (gp62), que es la precursora de una glicoproteína de superficie de 46 Kd (gp46) y una transmembranal de 21 Kd (gp21)¹¹. Se ha podido demostrar que son los antígenos virales predominantes, los que estimulan la producción de anticuerpos en los indivi-

duos infectados con HTLV-I¹⁰.

Otra línea de evidencia sugiere que los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas pueden neutralizar *in vitro* la formación de sincicios inducida por HTLV-I¹², además de neutralizar la infectividad de un pseudotipo del virus de la estomatitis vesicular que presenta las glicoproteínas de la envoltura viral¹³.

Mediante el empleo de proteínas producidas en sistemas bacterianos (proteínas recombinantes)¹⁴⁻¹⁶ y péptidos sintéticos¹⁷⁻¹⁹ que cubren diferentes regiones de las glicoproteínas de la envoltura viral, se ha podido establecer que la región más inmunoreactiva es la mitad carboxiloterminale; se ha demostrado también que esta región se puede utilizar para discriminar la infección de HTLV-I de la del HTLV-II.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para comparar la reactividad de anticuerpos a diferentes regiones de la gp62, se ensayaron 5 tipos de pro-

1. Profesor Titular, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

2. Asistente 1 de Investigación, Unidad de Virología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

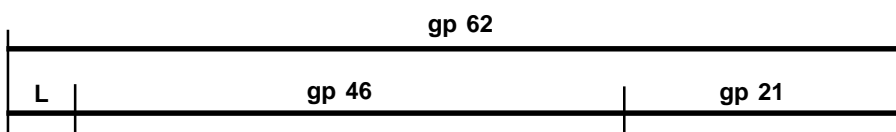
teínas recombinantes (PR) mediante la técnica de Western Blot. La Figura 1 muestra las diversas características de estas proteínas. La técnica sigue básicamente los protocolos descritos en Towbin *et al.*²⁰ y Harlow y Lane²¹. Las tiras de nitrato de celulosa se incubaron en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3% en PBS) durante 1 hora a 3° C. Luego se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con amortiguador de lavado (PBS pH 7.2, Tween 20 0.2%); cada tira se incubó con el suero del correspondiente individuo obtenido de la población de estudio, en dilución 1:500 y se incubó durante una hora a 37° C con agitación constante; se repitieron los pasos de lavados antes de adicionar la anti-IgG humana biotinilada dilución 1:500 y se incubaron una hora a 37° C en agitación constante. Luego, se adicionó el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano en dilución 1:500 y se incubó por una hora más a 37° C con agitación constante. Por último, las tiras se revelaron con el sustrato 3,3' diaminobencidina (DAB) tetraclorhidrato al 50% y 50 µl de H₂O₂ y la reacción se dejó proceder hasta la aparición de las bandas. Se empleó la prueba de Fisher exacta para valorar las diferencias de reactividad a cada proteína dentro de la población en estudio.

RESULTADOS

Con las pruebas ELISA y Western Blot se realizó un filtrado inicial a fin de determinar la seropositividad para HTLV-I en los sueros de individuos de Tumaco; todas las muestras seropositivas presentaban títulos altos. Los resultados de los ensayos con las diferentes proteínas recombinantes empleadas se resumen en el Cuadro 1.

De las muestras de los pacientes con PET 31.4% (15/35) y 27.3% (6/22) de los portadores sanos reaccio-

HTLV-I pg 62



Proteínas recombinantes

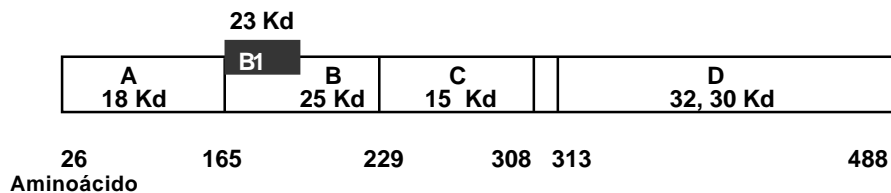


Figura 1. Diagrama esquemático de las proteínas recombinantes de la glicoproteína de la envoltura de HTLV-I. Se detalla la secuencia señal y los productos del procesamiento de la gp 62. La glicoproteína de superficie gp46 y la proteína transmembranal gp 21.

Cuadro 1
Reactividad de los Sueros Tanto de Pacientes Como de Individuos Seropositivos a las Proteínas Recombinantes de la Envoltura del HTLV-I

Estudio clínico	Proteínas recombinantes de envoltura					
	A	B	B1	C	(A+B+C)	D
PET	11/35 (31.4%)	33/37 (89.2%)	37/37 (100.0%)	37/37 (100.0%)	37/37 (100.0%)	23/37 (62.2%)
Portador	6/22 (27.3%)	33/35 (94.3%)	28/35 (80.0%)	34/35 (97.1%)	34/35 (97.1%)	16/34 (47.0%)
Total	17/57 (29.8%)	66/72 (91.7%)	65/72 (90.3%)	71/72 (98.6%)	71/72 (98.6%)	39/71 (54.9%)
P	0.74	0.67	0.004	0.48		1.9

naron con la PR-A; 89.2% (33/37) de los sueros de los individuos con PET y 94.3% de los portadores, reaccionaron con la PR-B; 100% (37/37) y 80% (28/35) de los sueros de los enfermos y portadores respectivamente, reaccionaron con la PR-B1; 100% (37/37) de los sueros de los sujetos con PET y 97.1% (34/35) de los portadores, reaccionan con la PR-C; 62.2% (23/37) y 47.0% (16/34) de los sueros obtenidos de enfermos con PET y portadores sanos respectivamente, reaccionaron con la PR-D.

Cuando se compararon los resultados de la reactividad en los sueros de los pacientes con PET y en los portadores sanos a las diversas pro-

teínas, se determinó que los sueros de los pacientes con PET/MAH son más reactivos a la PR-B1 que los sueros de portadores asintomáticos (p = 0.004). Además, al analizar los valores obtenidos de reactividad a la porción carboxiloterminale de la gp-46 (PR-B+PR-C) con los de la porción aminoterminale (PR-A) se encontró una diferencia significativa de p < 0.001. Se obtuvieron resultados de significancia similares (p < 0.001) cuando se confrontó la reactividad a PR- B1+PR-C vs. PR-A. De otra parte, al comparar la reactividad de anticuerpos con la gp46 (PR A+B+C) vs. la p 21 (PR-D) se demostró que hay una diferencia significativa (p < 0.002).

DISCUSIÓN

Tumaco es un municipio marítimo ubicado en el Pacífico Sur de Colombia, donde la prevalencia de anticuerpos a HTLV-I es mediana si se compara con la que hay en otras regiones del mundo⁵; sin embargo, la prevalencia de PET es una de las más altas del globo²². Estos antecedentes hacen válido el análisis de aislados de HTLV-I para estudiar no sólo la variabilidad genética sino la reactividad de los anticuerpos a las proteínas de la envoltura del virus. Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar la reactividad de los anticuerpos presentes en los individuos con PET/HAM y en los portadores seropositivos para el HTLV-I de Tumaco contra diferentes proteínas recombinantes de la gp62.

Aunque la técnica de Western Blot permite identificar sólo anticuerpos que reaccionan a epítopes lineales, de acuerdo con Baba *et al.*²³ más de 60% de los anticuerpos neutralizantes que reaccionan *in vivo* se dirigen contra epítopes lineales presentes en la gp46 del HTLV-I y menos de 40% de estos anticuerpos están ligados a epítopes conformacionales discontinuos. Este hecho sustenta el objetivo que se plantea en el presente trabajo, en el sentido de valorar inicialmente las regiones inmunodominantes y luego la determinación de epítopes neutralizantes en los aislados de Tumaco.

La región carboxiloterminale de la gp46 incluida dentro de las proteínas recombinantes B, B1 y C fue la más inmunorreactiva en las muestras analizadas siendo reconocida en 91.7%, 90.3% y 98.6% respectivamente por los anticuerpos anti-HTLV-I presentes en los individuos estudiados. Estos resultados concuerdan con los informes de Chen *et al.*¹⁴, aunque los datos de reactividad a estas proteínas son un poco más bajos (89.6%, 70.2%

y 92.9% respectivamente); estas diferencias se pueden explicar si se incluyen varios aspectos: primero, uno de ellos, que los individuos del estudio de Chen *et al.*¹⁴, eran enfermos con ATL; segundo, que había un número mayor de individuos; y, tercero, que se trataba de aspectos meramente genéticos.

Al comparar los resultados del presente trabajo con los de Chen *et al.*¹⁴, hubo dos variaciones significativas; la primera de ellas que la proteína recombinante B1 exhibió diferencias estadísticamente significantes cuando se comparó la reactividad de los anticuerpos de portadores de HTLV-I con los de pacientes con PET/HAM, ($p=0.004$); estos resultados permiten proponer probablemente, que en los individuos donde se desarrolló la enfermedad, pudo haber cambios en la reactividad de este epítipo en la gp46 (a.a 166-201) o que se expondrían más regiones antigénicas que en el estadio de portador no se encuentran. Estos cambios podrían incluir alteraciones estructurales en la proteína o alguna variación en la secuencia de nucleótidos que puede afectar la antigenicidad de esta región (aminoácidos 166-201 de la gp46).

Con base en las consideraciones anteriores, se justifica entonces, realizar un análisis de secuencias de nucleótidos en aislados tanto de portadores como de pacientes con PET, con el objeto de evaluar si estos cambios de reactividad se asocian con mutaciones específicas en ciertas regiones de la gp62.

El otro aspecto en el que difiere el presente estudio del de Chen, *et al.*¹⁴, reside en los porcentajes de serorreactividad a la PR-D que fueron estadísticamente significativos ($p<0.01$) entre pacientes con ATL y portadores; esta diferencia y la hallada en Cali en la B1 no permitió encontrar una relación directa con el desarrollo de la

enfermedad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sustentan la hipótesis general que la región carboxiloterminale de la gp46 es la más inmunorreactiva; en este sentido¹⁸ el uso de péptidos sintéticos, demostró que sueros provenientes de individuos seropositivos, enfermos con ATL y pacientes con PET/MAH, reaccionaban con regiones entre los aminoácidos 176-199 y 190-212 en 73% y 87% respectivamente. Además Palker *et al.*¹⁷, obtuvieron como resultado de un análisis similar, un péptido que comprendía los aminoácidos (a.a.) 190-209 que reaccionaban con 78% de los sueros de su población de estudio. Estas secuencias de a.a. se sobreponen con las incluidas en las proteínas recombinantes PR-B1 y PR-B.

La importancia de la inmunorreactividad de esta región radica en que se han determinado anticuerpos neutralizantes dirigidos contra epítopes en dicho sector; a.a.175-199²³, a.a. 187-193²⁴ y a.a. 191-196²⁵. Los porcentajes de reactividad contra péptidos sintéticos de la gp46 son más bajos que los obtenidos contra proteínas recombinantes, muy probablemente debido a que estas últimas tienen una extensión mayor y por ende mayor será la probabilidad de tener un mayor número de epítopes reunidos.

Un aspecto interesante, es que el mapeo de epítopes realizado sobre la glicoproteína de la envoltura de HTLV-II, señaló a la región comprendida entre los a.a. 173-209, como la más inmunorreactiva, 97% de los sueros ensayados reconocen este segmento¹⁶. Este hecho puede explicar en parte, el porqué de la reactividad cruzada entre los dos virus. Aunque esta región exhibe diferencias significativas en la secuencia de a.a. entre ellos, parece que estimula una fuerte respuesta humoral.

La proteína recombinante C, que comprende los a.a. 229-308, es la más inmunorreactiva a los anti cuerpos hallados en los sueros de individuos incluidos en este estudio, 98.6%. Lal *et al.*¹⁸, restringieron más el epítipo inmunodominante; estos autores obtuvieron una reactividad de 100% cuando enfrentaron sueros de 52 individuos (seropositivos, pacientes con ATL y PET/MAH) contra el péptido sintético Env5 a.a. 242- 257. Horal *et al.*¹⁹ obtuvieron porcentajes de seroreactividad más bajos cuando utilizaron péptidos sintéticos que comprendían los a.a. 240-262 (89%) y 292-314 (78%); de nuevo, la importancia de esta región inmunodominante radica en que se han podido producir anticuerpos neutralizantes contra epítopes localizados en esta región (a.a. 213-236 y 288-317)²³. No sólo se ha obtenido una respuesta inmune de tipo humoral en individuos infectados con HTLV-I contra los epítopes antes descritos, sino que Jacobson *et al.*²⁶ determinaron que hay una respuesta de tipo celular, montada contra estos mismos epítopes.

A 4 de los individuos seropositivos para HTLV-I, se les descubrió, amplificó y secuenció un fragmento de 383pb del gen ENV. Esta región que comprende los nucleótidos 5406-5789, codifica por un fragmento de a.a. de la gp46, que concuerda con las PR-B y PR-B1. A pesar de que se determinaron cambios de a.a. con propiedades químicas diferentes, éstos conservaban su capacidad para estimular una respuesta inmune humoral.

SUMMARY

By Western Blot, the reactivity of seropositive individuals from the town of Tumaco, against different regions of the viral envelope glycoproteins was evaluated. It was determined that

the carboxyl end of the gp-46 (amino acids 166 to 308) had the maximum immunoresponse with a ratio of reactivity ranging from 80% to 100%. This region represents a potential for developing a broad spectrum vaccine. Furthermore the region between aminoacids 166-201 of the gp-46 of HTLV- 1 revealed a compatible reaction with sera from 100% of individuals with TSP/HAM (tropical spastic paraparesis/ HTLV-I associated myelopathy), in contrast, only 80% of sera from asymptomatic individuals yielding a positive reaction, (p = 0.004) was observed. Based on these results, it is proposed that during the progress of a viral infection, functional changes in defined regions of the envelope glycoprotein would modulate the immunoresponse in HTLV-I seropositive individuals.

REFERENCIAS

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Mina JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-19.
- Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, *et al.* Antibodies to adult T-cell leukemia virus associated antigen (ATLV) in sera from patients with ATLL and controls in Japan. A nation-wide seroepidemiological study. *Int J Cancer* 1985; 29: 631-35.
- Gessain A, Barin F, Vernant C, *et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2: 307-410.
- Bangham CRM, Daenke S, Phillips RE, *et al.* Enzymatic amplification of exogenous and endogenous retroviral sequences from DNA of patients with tropical spastic paraparesis. *Embo J* 1988; 7: 4179-84.
- Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 37-52.
- Zaninovic V, Biojó R, Barreto P. Paraparesia espástica del Pacífico. *Colombia Med* 1981; 12: 111-17.
- Arango C, Concha M, Zaninovic V, *et al.* Epidemiology of tropical spastic

paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Ann Neurol* 1988; 23 (suppl): S161-S65.

- Román GC, Román LN, Spencer PC, Shoemberg BS. Tropical spastic paraparesis. A neuroepidemiological study in Colombia. *Ann Neurol* 1985 17: 361-65.
- Dueñas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR, *et al.* Coexistence of human T-lymphotropic virus types I and II among the Wayuu Indians from the Guajira region of Colombia. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1992; 8: 1851-55.
- Lee TH, Coligan JE, Homman T, McLane MF, Tachibana N, Essex M. Human T-cell leukemia virus associated membrane antigens (HTLV-MA): identity of the major antigens recognized following infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 81: 3856-60.
- Hattori S, Kiyoka T, Imagawa K, Shimizu F, Hashimura E, Seiki M, Yoshida M. Identification of gag and env gene products of human T-cell leukemia virus (HTLV). *Virology* 1984; 188: 338-47.
- Hoshimo H, Shinoyama M, Miwa M, Sugimura T. Detection of lymphocytes producing a human retrovirus associated with adult T-cell leukemia by syncytium induction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7337-41.
- Clapham P, Nagy K, Weiss RA. Pseudotypes of human T-cell leukemia virus types I and II: neutralization by patient's sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2886-89.
- Chen YA, Lee TH, Samuel KP. Antibody reactivity to different regions of human T-cell leukemia virus type I gp61 in infected people. *J Virol* 1989; 63: 4952-57.
- Lipka JJ, Bui K, Reyes GR. Determination of a unique and immunodominant epitope of human T-cell lymphotropic virus type I. *J Infect Dis* 1990; 162: 353-57.
- Lal RB, Rudolph DL, Kapla J, *et al.* Identification of immunodominant epitopes in envelope glycoprotein of human T-cell lymphotropic virus type II. *Virology* 1992; 186: 274-76.
- Palker JJ, Tanner ME, Scerace RM, Streilein RD, Clark ME, Haynes BF. Mapping of immunogenic region of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope glycoproteins with env encoded synthetic peptide and monoclonal antibodies to gp46. *J Immunol* 1989; 142: 971-78.
- Lal RB, Rudolph DL, Lairmore MD, *et al.* Serologic discrimination of human T-cell lymphotropic virus infection by using a synthetic peptide-based enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 1991; 163: 41-6.

19. Horal P, Hall WW, Svennerholm B, *et al.* Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp-46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses types I and II using synthetic peptides. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1991; 88: 5754-57.
20. Towin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-56.
21. Harlow W, Lane J. *Antibodies: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Press, 1988.
22. Arango C, Concha M, Trujillo, JM, Biojó R. Tropical spastic paraparesis associated risk factors in Tumaco, Colombia. In Blattner W. (ed.) *Human Retrovirology: HTLV*. New York, Raven Press Ltd., 1990, pp. 337-42.
23. Baba E, Nakamura M, Tanaka J, *et al.* Multiple neutralizing B-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) identified by human monoclonal antibodies. *J Immunol* 1993; 151: 1013-18.
24. Kuroki M, Nakamura M, Itoyama Y. Identification of new epitopes recognized by human monoclonal antibodies with neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities specific for human T-cell leukemia virus type I. *J Immunol* 1992; 149: 940-45.
25. Tanaka Y, Zeng I, Shiraki H, Shida H, Tozawa I. Identification of a neutralization epitope on the envelope gp-46 antigen of human T-cell leukemia virus type I and induction of neutralizing antibody by peptide immunization. *J Immunol* 1991; 147: 354-59.
26. Jacobson S, Reuben JS, Strelein RD, Palker TJ. Induction of CD4+, human T lymphotropic virus type I-specific cytotoxic T lymphocytes from patients with TSP/HAM. *J Immunol* 1991; 146: 1155-59.