

# Determinación de la respuesta humoral de diferentes clases de inmunoglobulinas en el fluido oral de individuos infectados por el virus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1)

Norma González. MSc.\*  
Abraham Blank. MD\*\*  
Martha C. Domínguez. MSc.\*  
Felipe García Vallejo. PhD.\*

## Resumen

**Objetivos:** estudiar detalladamente la respuesta humoral de las distintas clases de inmunoglobulinas en el fluido oral de individuos infectados con el HTLV-I, compararla con la del suero y correlacionarla con la existencia de una replicación viral activa en la mucosa oral. **Métodos:** se determinaron mediante ELISA y western blot las respuestas de IgG, IgM e IgAs específicas para las proteínas de HTLV-I tanto en el suero como en el fluido oral (FO) de 14 pacientes con paraparesia espástica tropical, mielopatía asociada al HTLV-I (PET/MAH), 11 seropositivos asintomáticos y 12 controles seronegativos. Mediante RT-PCR se amplificaron moldes de RNA genómico viral de pol y tax presentes en el FO. Los datos fueron sometidos a diferentes pruebas de decisión estadística. **Resultados:** el total

de muestras de suero y FO incluidos en el estudio mostró una distribución diferencial en el contenido de anticuerpos IgG, IgM e IgAs específicos para antígenos virales. Aquellos individuos que contenían inmunoglobulinas anti-HTLV-I en FO mostraron patrones de western blot de IgG e IgAs contra las proteínas gp61/68, p55/53, gp46, p40, p24 y p19, además de las recombinantes r-tax y r-env. En general, fluidos orales con niveles detectables de IgAs, mostraron amplificación del cDNA para los genes tax y pol. **Conclusión:** los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la dinámica de la respuesta inmune a la infección por el virus en la mucosa oral es compleja e involucra múltiples procesos. **Palabras clave:** Retrovirus, Mucosa Oral, RT-PCR, Respuesta Inmune Humoral, Fluido Oral. *Infectio 2002; 6(3): 149-155*

## Introducción

El virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) es un retrovirus incluido dentro del grupo PTLV de la Subfamilia Oncoviridae. Está principalmente asociado con la leucemia de células T del adulto (ATL) (1,2) y con la paraparesia espástica tropical, mielopatía asociada al HTLV-I (PET/MAH) (3,4); sin embargo, se describen, cada día, asociaciones con múltiples entidades clínicas. La infección por el virus es de distribución mundial, e incluye muchas regiones endémicas del Sur y Norte de América, el Sudeste del Japón, la región del Caribe y África. El sur-

occidente del Pacífico colombiano y especialmente, el municipio de Tumaco, son zonas endémicas para el HTLV-I en las que se registra una elevada relación de incremento anual de casos de PET/MAH (5, 6).

El HTLV-I se transmite por contacto sexual (7), transfusión de sangre contaminada (8), drogadicción intravenosa (9) y por transmisión vertical madre-hijo, principalmente por la lactancia (10, 11). Recientemente, también se ha propuesto la transmisión a través de la saliva, no sólo por la detección de RNA genómico viral en la saliva de pacientes con ATL, como por la determinación de

\* Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle.

\*\* Laboratorio Sasakawa. Departamento de Morfología. Facultad de Salud. Universidad del Valle.

Correspondencia: Felipe García-Vallejo, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia. A. A. 25360. Correo electrónico: labiomol@hotmail.com

anticuerpos contra proteínas virales en FO de individuos seropositivos (12, 13).

En este trabajo se determinaron las respuestas de IgG, IgM e IgAs específicas contra las proteínas de HTLV-I en el FO de individuos infectados y se correlacionó con la presencia de RNA viral genómico libre en el FO de pacientes. Los resultados han permitido comparar más detalladamente las respuestas inmunes humorales a la infección por el HTLV-I en el FO y en el suero.

## Métodos

### Población objeto

Para el estudio se seleccionaron, con base en la prueba de aglutinación de partículas P.A (Serodia, Fujirebio. Japón), 14 individuos seropositivos con diagnóstico de PET/MAH, 11 seropositivos portadores asintomáticos y 12 controles seronegativos para el HTLV-I. Todos los sujetos incluidos en el estudio provenían tanto de la consulta externa del Hospital Universitario del Valle "Evaristo García", como de estudios de serovigilancia realizados por nuestro grupo en diferentes municipios del Suroccidente colombiano. Todos ellos fueron informados de los objetivos del estudio y firmaron un consentimiento para su realización, además de la publicación científica de los resultados.

Los individuos se confirmaron como seropositivos para el HTLV-I mediante la prueba de Western Blot y se reconfirmaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del DNA de linfocitos, empleando cebadores específicos que amplificaron un fragmento de 189 bp del gene Pol (13). Para la caracterización de los pacientes con PET/MAH se emplearon los criterios establecidos por Osame et al (1986) (14).

### Recolección del Fluido Oral (FO)

El FO se obtuvo utilizando el colector Orasure® (Epitope Inc., Beaverton. OR. USA), aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de la recolección del FO, se realizó un enjuague bucal con 5 ml de medio RPMI 1640 durante un minuto (13). Una vez tomada la muestra, el dispositivo de recolección se transfirió a un tubo que contenía una solución de conservación. El contenido colectado en la esponja se centrifugó a 454 x g y se almacenó a 4°C hasta su uso. Este procedimiento evita la contaminación de las muestras con esputo.

### Pruebas serológicas

Los niveles de IgG, IgM y IgAs anti-HTLV-I, tanto en el suero como en FO, se midieron usando el estuche comercial HTLV-I 2.0 EIA (ABBOTT, Abbott Park, IL. USA). Las muestras de FO y suero se diluyeron a concentraciones apropiadas (1:100 y 1:20 respectivamente) en 2% de albúmina sérica bovina fracción V en PBS 1 X pH 7,4 y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Los pasos posteriores se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia de cada muestra se midió con ayuda de un equipo Quantum (ABBOTT, Abbott Park, IL. USA). Los niveles de anticuerpos para cada clase de inmunoglobulina se registraron como valores de absorbancia a 492 nm ( $OD_{492\text{ nm}}$ ). Posteriormente, cada uno de los valores de  $O.D_{492\text{ nm}}$  se convirtieron en relación de absorbancias dividiendo el valor de  $O.D_{492\text{ nm}}$  de la muestra sobre el valor de  $O.D_{492\text{ nm}}$  del punto de corte de cada prueba. Relaciones de  $O.D_{492\text{ nm}} \geq 1.3$  se consideraron positivas.

Para la determinación de la respuesta humoral a cada una de las proteínas virales, se utilizó el estuche de western blot "HTLV blot 2.4 Assay" (Genelabs® Diagnostics Pte Ltd. Singapore Science Park. Singapore), adicionalmente se ensayó la reactividad de los FO a las proteínas recombinantes r-tax y r-env. Las tiras se ensayaron en diferentes diluciones de suero y FO. Se incubaron en 1% de albúmina sérica bovina fracción V, PBS 1X pH 7.4 y 02% de Tween 20 por 1 hora a 37°C siguiendo la metodología desarrollada por Barin et al, (1985) (15).

### Amplificación por RT-PCR del RNA genómico viral presente en el FO

A partir de 200 ml de fluido oral, se extrajo el RNA total utilizando para ello el estuche "QIAamp Viral RNA mini kit" (Qiagen Co., Valencia. CA) empleando las condiciones recomendadas por la casa fabricante. La síntesis de cDNA de tax y pol se realizó en solución de 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 90 mM KCl (1 X RT buffer), 0.9 mM MnCl<sub>2</sub>, 375 mM de cada dNTP, and 750 nM de oligonucleótido cebador para HTLV-I pol SK111(-) (4920-GTGGTGGATTTGC-CATCGGGTTTT-4897) y tax SK44(-) (7516-GAGCCGATAACGGCGTCCATCG-7496), 100 ng de RNA y 4 U de Tth DNA polymerase (*Thermus thermophilus* DNA polymerase, Boehringer Mannheim. Germany) durante 30 minutos a 70°. El cDNA obtenido fue sometido a 40 ciclos de PCR en 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 100 mM KCl, (1 X PCR buffer), 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM EDTA, 750 nM HTLV-I de

los cebadores SK110(+) (4757 CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-4778) y SK43(+) (7358-GTACCGGTGGCGGTCTGG-CTT-7377). Los amplicones se determinaron mediante electroforesis en geles de agarosa del 1.5%. Los fragmentos de DNA se identificaron mediante la metodología de hibridación en Southern utilizando sondas apropiadas para HTLV-I (13).

### Cálculos estadísticos

Los niveles de significación estadística en muestras pareadas se calcularon mediante la aplicación de la prueba exacta de Fisher utilizando el programa Epi-info versión 6.0. Empleando el programa SPSS versión 8.0 se calcularon los valores de correlación no paramétrica de Spearman ( $\rho$ ).

## Resultados

### Determinación de las diferentes clases de inmunoglobulinas en suero y FO de individuos infectados

El 100% de los pacientes PET/MAH mostraron anticuerpos IgG anti-HTLV-I en el FO en comparación con 72.7% (8/11) de los portadores asintomáticos ( $P=0.0717$ ). En las muestras seropositivas para el HTLV-I que se incluyeron en el estudio, la presencia de IgAs específica en FO fue más frecuente en pacientes PET/MAH que en asintomáticos ( $p=0.00513$ ) (tabla 1). De otra parte la frecuencia de reactividad, en FO, para IgM fue significativa entre pacientes y portadores asintomáticos ( $p=0.00483$ ) (tabla 1). Tres individuos seropositivos asintomáticos que no presentaron IgG anti-HTLV-I en suero, tuvieron anticuerpos IgAs específicos para el virus en su fluido oral. En este estudio no se observaron diferencias significativas entre pacientes y seropositivos asintomáticos para edad y sexo. En todos los controles negativos no se detectaron inmunoglobulinas contra HTLV-I tanto en suero como en FO.

Los valores de coeficiente de correlación de Spearman entre pacientes PET/MAH y seropositivos asintomáticos para los contenidos de IgG en suero e IgG en FO (0.636), de IgM e IgAs en FO (0.687); de IgM en suero e IgAs en FO (0.775) fueron altamente significantes a nivel de  $\alpha$  de 0.01. En contraste el contenido de IgG e IgM en suero (0.447); de IgG en suero e IgAs en FO (0.455) fueron significantes a nivel de  $\alpha$  de 0.05.

### Repertorio de anticuerpos contra las diferentes proteínas de HTLV-I en suero y FO

En los individuos que tenían niveles detectables de inmunoglobulinas contra HTLV-I tanto en suero como en FO se observaron patrones de western blot de IgG e IgAs contra las proteínas virales gp61/68, gp46 y p24 que forman parte de la envoltura, p55/53 la polimerasa, p24 y p19 gag y p20 y 42 tax (figura 1.a), además de las proteínas recombinantes r-tax y r-env (B1) (figura 1.b).

El análisis comparativo de la reactividad de cada una de las proteínas del HTLV-I a las tres clases de inmunoglobulinas en suero y FO de los pacientes PET/MAH y de los seropositivos asintomáticos, reveló diferencias importantes. Anticuerpos IgG anti p53-55, p19 y r-tax fueron más frecuentes en el FO de pacientes PET/MAH. En contraste con los de las proteínas p28 y p24 que se observaron con mayor frecuencia en seropositivos asintomáticos. Las fracciones de IgAs específicas para proteínas del virus mostraron diferencias significativas entre pacientes PET/MAH y seropositivos asintomáticos para las proteínas p40 ( $p=0.0502$ ), p24 ( $p=0.006$ ), p19 ( $p=0.00113$ ) además de r-tax ( $p=0.0502$ ) (figura 2).

### Determinación de RNA genómico en el fluido oral

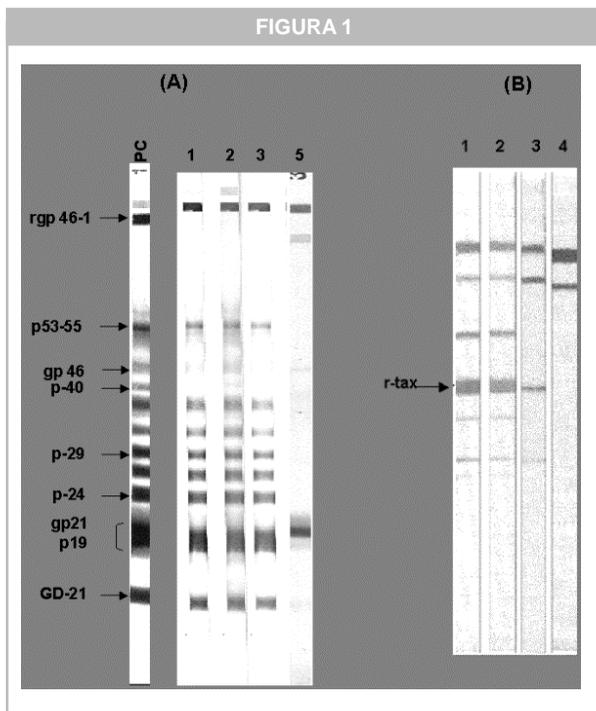
En el 85.7% (12/14) de los fluidos orales de los pacientes PET/MAH se determinaron moldes de RNA

TABLA 1

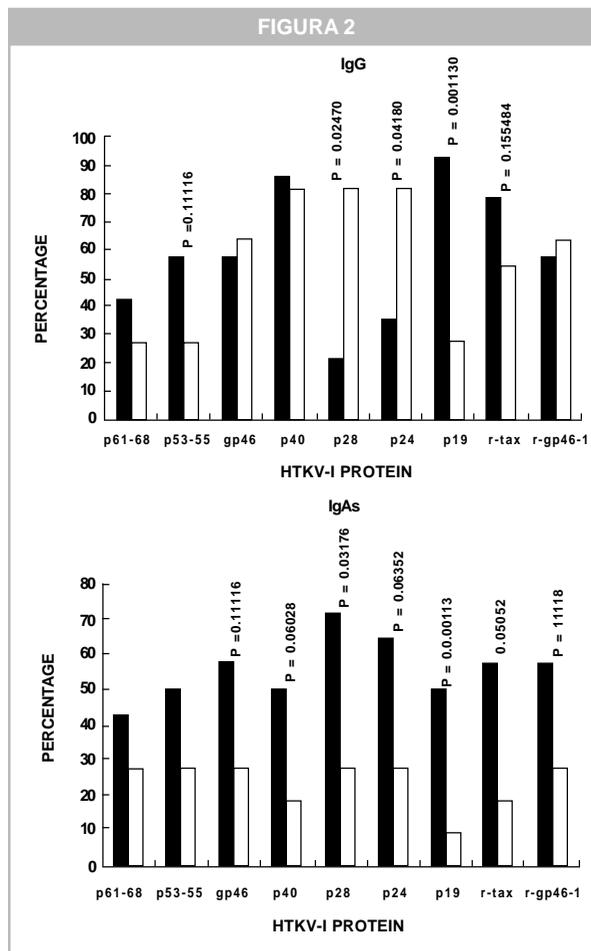
Frecuencia de reacción en suero y fluido oral a diferentes clases de inmunoglobulinas en individuos infectados por el HTLV-I

	Suero		Fluido oral		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgAs
PET/MAH	14/14	11/14	14/14	8/14	12/14
Asintomáticos <sup>(a)</sup>	8/11	2/11	8/11	2/11	3/11
p <sup>(b)</sup>	> 0.05	0.00483	> 0.05	> 0.05	0.00513

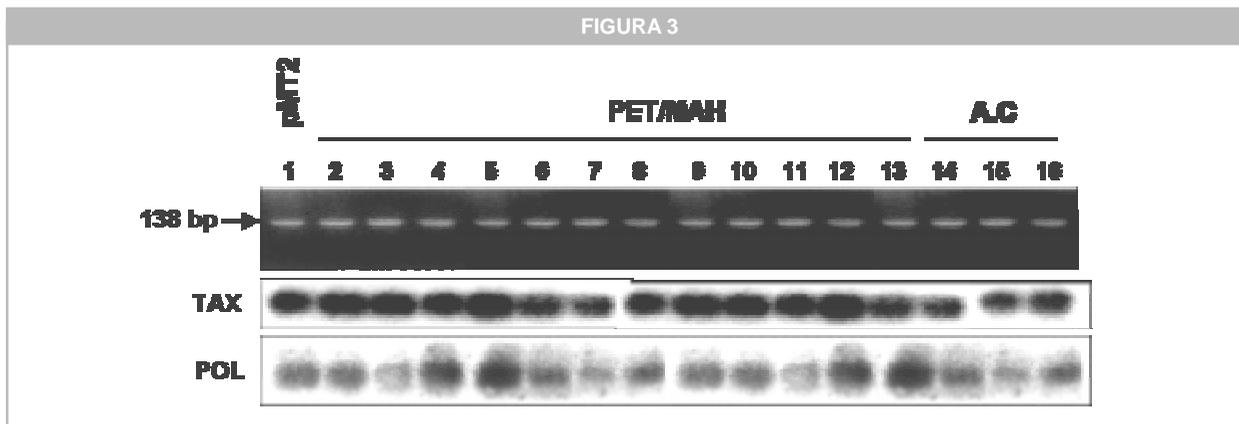
(a) Se incluyeron tres portadores asintomáticos que no tenían IgG en suero pero si IgAs en FO. (b). Los valores de p se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher.



Perfiles de Western blot de IgG y IgAs específicas para proteínas del HTLV-I en el suero y en el fluido oral de un paciente PET/MAH proveniente del Suroccidente colombiano. (A). Western blot en suero y FO con el estuche comercial HTLV blot 2.4. (PC) Control positivo del estuche (1) Suero de paciente PET/MAH. (2) IgG anti-HTLV-I en fluido oral del mismo paciente. (3) IgAs anti-HTLV-I en fluido oral del mismo paciente. (4) Control negativo del estuche. (Los números al lado de cada flecha corresponden a los valores de masas moleculares relativas de las diferentes proteínas del HTLV-I). (B). Western blot en suero y FO con una proteína recombinante de tax. (1) IgG en suero. (2) IgG en FO. (3) IgAs en OF. (4) Control negativo. La flecha indica la banda de 50 Kd reactiva que corresponde a la proteína recombinante tax .



Distribución de las frecuencias de anticuerpos IgG y IgAs contra las proteínas del HTLV-I en el fluido oral de pacientes PET/MAH y seropositivos asintomáticos provenientes del Suroccidente colombiano. Los valores indicados corresponden a las probabilidades calculadas mediante la prueba exacta de Fisher. (■): Pacientes PET/MAH. (□): Seropositivos asintomáticos.



Hibridación en Southern blot de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de RNA genómico libre de los genes Tax y Pol presentes en el fluido oral de pacientes PET/MAH (carriles 2 a 13) y seropositivos asintomáticos (carriles 14 a 16) que tenían niveles detectables de IgAs específica para HTLV-I en en fluido oral. Como sonda de hibridación se utilizó el plásmido recombinante pMT2 marcado radiactivamente (<sup>32</sup>P-pMT2) (carril 1) .

genómico para los genes tax y pol, mientras que sólo el 27.3% (3/11) de los fluidos orales de los individuos seropositivos asintomáticos tuvieron los RNA genómicos correspondientes ( $p=0.00513$ ) (figura 3).

## Discusión

Aunque la existencia de una respuesta inmune humoral al HTLV-I en fluidos orales había sido documentada previamente, los detalles con respecto al repertorio de clases de anticuerpos contra proteínas virales no habían sido estudiados, por lo tanto nuestros resultados permitieron conocer de manera más detallada la respuesta inmune humoral en la mucosa oral, tanto en pacientes PET/MAH como en individuos seropositivos asintomáticos. Además, la alta relación que se demostró, en este trabajo, entre la existencia de una mayor frecuencia de IgAs contra proteínas virales en los pacientes PET/MAH con la presencia de RNA genómico viral para tax y pol presente en los fluidos orales, es una evidencia muy fuerte que sustenta la hipótesis de la existencia de una replicación del virus en algunos de los componentes de la mucosa oral como parte de la dispersión sistémica del virus.

La respuesta inmune humoral oral es compleja y está compuesta tanto por anticuerpos de tipo IgG presentes en transudados séricos como por IgAs producida como respuesta inmune de la mucosa bucal. En este trabajo se determinaron tres individuos portadores asintomáticos que aunque no tenían niveles detectables de IgG en suero presentaban, en sus FO, altos títulos de IgAs específica. Este resultado demuestra la existencia de una respuesta humoral activa de la mucosa oral; así la IgAs, en estos casos, fue un marcador de respuesta inmune local. Por otra parte, es también una evidencia muy fuerte de que existiría una replicación viral activa en algunas células de la mucosa oral.

La diferencia, que se observó en este estudio, en la distribución de los patrones de western blot de ambos fluidos, es una evidencia de que los procesos que modulan la respuesta humoral en la mucosa oral de individuos HTLV-I positivos son diferentes a los que operan en los linfocitos séricos. La fuente principal de IgG en fluidos orales es el transudado gingivocrevicular, la diferencia observada en el contenido de anticuerpos para cada proteína viral tanto en pacientes como en portadores asintomáticos, sugiere que debe existir un mecanismo de liberación selectiva de ciertas poblaciones de inmunoglobulinas anti-proteínas del

HTLV-I, este resultado ayudaría a explicar la diferencia en los patrones que se observaron en suero y FO.

Un estudio previo realizado por nuestro grupo, demostró que anticuerpos IgM en el suero e IgAs en el fluido gingivocrevicular rico en saliva (FGC-RS) de pacientes PET/MAH estaban correlacionados con la presencia de RNA viral en contraste con la baja frecuencia de éstos, la baja carga proviral y la baja frecuencia de IgM en suero e IgAs en FGC-RS de individuos seropositivos asintomáticos (13). También se ha observado un incremento de la carga proviral y de antígenos asociados con la replicación del HTLV-I (p40 y p26-27) que inducen la respuesta de IgM sérica como indicadores de la progresión de la PET/MAH (16, 17). Estudios previos también demostraron que inmunoglobulinas séricas IgM e IgA detectadas contra proteínas tax y env son las que más frecuentemente se encuentran en pacientes PET/MAH (10, 18 - 26). En este sentido los resultados obtenidos muestran que además de los indicadores séricos, la IgG e IgAs, la presencia de RNAs genómicos virales presentes en los FO, es también de hecho, un indicador de progresión de la enfermedad.

La respuesta en fluido oral que se observó en este trabajo, se caracterizó por la predominancia de IgG contra las proteínas virales p19 y p29; de IgM para p29 y p17) e IgAs para p40 y p29. Así, el disturbio inmune humoral determinado en pacientes con PET/MAH cuando la enfermedad ya se ha desarrollado confirma la importancia de evaluar algunos marcadores inmunológicos y moleculares para obtener un mejor entendimiento de los mecanismos de patogénesis que controlan la enfermedad. En este contexto, la presencia en FO de RNA genómico libre para pol y tax debe considerarse como un evento importante durante el desarrollo y progresión de la enfermedad. b

## Abstract

**Objectives:** To study in detail the humoral response by different immunoglobulin classes in oral fluids from seropositive individuals infected with HTLV-I and to correlate it with an active viral replication in the oral mucosa. **Methods:** From 14 TSP/HAM patients, 11 asymptomatic carriers and 12 negative controls by ELISA and western blot the response of specific IgG, IgM and sIgA to all HTLV-I proteins of either serum or oral fluid were determined. Through RT-PCR viral genomic RNA templates of Pol and tax present in

the oral fluid were amplified. Data were submitted to different statistical tests. **Results:** The total of serum and OF samples included in this study showed a differential distribution in the IgG, IgM and sIgA HTLV-I specific antibodies. Those individuals who had IgG and sIgA anti-HTLV-I in oral fluids exhibited western blot reactivities against gp61/68, p55/53, gp46, p24 and p19 besides the recombinant proteins r-tax and r-env. In general oral fluids with detectable levels of sIgA showed amplification of genomic viral RNA templates for pol and tax. **Conclusions:** The results support the hypothesis that the immune response to the virus infection in oral mucosa is complex and involve several process. **Key words:** Retrovirus, Oral Mucosa, RT-PCR, Humoral Immune Response, Oral fluids.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Señora Ángela García por su excelente asistencia editorial y a Jesús Cabrera por sus críticas y sugerencias a este trabajo. A la firma Care Life por el suministro de colectores. Este proyecto fue ejecutado con fondos de COLCIENCIAS y la Universidad del Valle (proyecto número 1106-04-199-96). También como parte del convenido de cooperación entre la Universidad del Valle y el Centro de Enfermedades Crónicas Virales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kagoshima, Japón. Este trabajo se efectuó siguiendo las normas de bioseguridad de nivel P2.

## Referencias

1. **Poiesz B J, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, and 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: 7415-7419.
2. **Hinuma Y, Nagata K, and Hanoka M.** Adult T-cell leukemia: antigens in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6476-6480.
3. **Gessain A, Francis H, and Sonan C.** HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Africa. *Lancet* 1986; ii: 698 .
4. **Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, and Tara M.** HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986; i: 1031-1032 .
5. **Arango C, Concha M, Zaninovic V, Borrero I.** Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Ann Neurol* 1988; 23: suppl: s161-s165.
6. **Trujillo CM, Concha M, Muñoz A, Bergonzoli G, Mora C, Borrero I, and Arango C.** Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco Colombia. *AIDS Res Humm Retroviruses* 1992; 8: 651-657.
7. **Yoshida M, Osame M, Kawai H.** Increased replication of HTLV-I in HTLV-I associated myelopathy. *Ann Neurol* 1989; 26: 331-335.
8. **Renjifo B, Borrero I, Essex M.** Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *J Virol* 1995; 69: 2611-2616.
9. **Gout O, Baulac M, Gessain A, Semah F, Saal F, Peries J, Cabrol C, Foucault-Fretz C, Laplane D, Sigaux F, De The G.** Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1990; 322: 383-388.
10. **Hino S.** Maternal infant transmission of HTLV-I: implication for disease. in *Human Retrovirology HTLV*. ed. W A Blattner. Raven Press LTD, New York 1990; 363-375.
11. **Hocini S, Iscaki S, Bouvet JP, Pillot J.** Unexpectedly high levels of some presumably protective secretory immunoglobulin A antibodies to dental plaque bacteria in salivas of both caries-resistant and caries-susceptible subjects. *Infect Immun* 1993; 61: 3597-3604.
12. **Ishihara S, Okayama A, Stuver S, Horinouchi H, Shiori K, Murai T, Kubota R, Yamashita N, Tachibana N, Tsuboshi H, Mueller N.** Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Imune Defic Syndr* 1994; 7: 199-203.
13. **Soto L, García-Vallejo F, Renjifo B, Domínguez M, Vergara A, Essex M.** Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-Specific antibodies and cell-free RNA in crevicular fluid-rich saliva from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *Viral Immunology* 1995; 8: 141-150.
14. **Osame M, Izumo S, and Igata A.** Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 1986; ii: 104-105.
15. **Barin F, M'Boup S, Denis F, et al.** Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 1985; ii: 1387-9.
16. **Kira J, Nakamura M, Sawada T.** Antibody titers to HTLV-I-p40tax protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J Neurol* 1992; 107: 98-104.
17. **Manns A, Hisada M, Le Grenade L.** Human T Lymphotropic type I virus infection. *Lancet* 1999; 353: 1951-58.
18. **Fang CT, Wilians AE, Slamon DJ, Poiesz B.** Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Transfusion* 1988; 28: 179-183.

19. **Lee TH, Coligan JE, Homma T, McLane MF, Tachibana N, and Essex M.** Human T-cell leukemia virus-associated membrane antigens: identity of the major antigens recognized after virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3856-3860.
20. **Kira J, Nakamura M, Sawada T.** Antibody titers to HTLV-I-p40tax protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J Neurol* 1992; 107: 98-104.
21. **Lal RB, Giam CZ, Coligan JE, and Rudolph DL.** Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T-cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy. *J infect Dis* 1994; 169: 496-503.
22. **Nakamura M, Itoyama Y, Kuroki M.** Increase of peripheral lymphocytes committed to the production of monoreactive and high affinity antibodies to HTLV-I in patients with TSP/HAM. *J Neuroimmunol* 1992; 37: 35-45.
23. **García-Vallejo F, Soto L, Renjifo B, Chou K, Domínguez MC, Essex M.** Free human T-cell Leukemia virus type I (HTLV-I) RNA templates in sera from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy is correlated with increased titers of IgM and IgA. *J AIDS and Human Retrovirol* 1995; 10: 83.
24. **García-Vallejo F, Soto-Ramírez L, Chou K, Lin JM, Borrero I, Essex M.** Increased immunoglobulin levels in sera from patients with HTLV-I-associated myelopathy tropical spastic paraparesis in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1994; 10: 507.
25. **Soto-Ramírez L, , García-Vallejo F, Vergara A, Borrero I, Marlink R, Essex M.** Antibodies to HTLV-I in gingival crevicular fluid of TRP and seropositive individuals from Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1994; 10: 446.
26. **García -Vallejo F.** Molecular and immunological characteristics in the pathogenesis of tropical spastic paraparesis-HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *Ciencia e Cultura JBAAS* 1996; 48: 351-358.