

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN
POR EL NUEVO RETROVIRUS HUMANO XMRV
(XENOTROPIC MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED
VIRUS) EN DIFERENTES GRUPOS DE POBLACIÓN EN
ESPAÑA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Miguel Arredondo Calvo

Bajo la dirección de los doctores

Carmen de Mendoza Fernández
Vicente Soriano Vázquez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR
EL NUEVO RETROVIRUS HUMANO XMRV
(XENOTROPIC MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS)
EN DIFERENTES GRUPOS DE POBLACIÓN EN ESPAÑA**

TESIS DOCTORAL

Miguel Arredondo Calvo

Madrid, 2012

Tesis Doctoral

**DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL
NUEVO RETROVIRUS HUMANO XMRV (XENOTROPIC MURINE
LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS) EN DIFERENTES GRUPOS
DE POBLACIÓN EN ESPAÑA**

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biomédicas por la Universidad Complutense de Madrid por el licenciado:

Miguel Arredondo Calvo

Directores de Tesis:

Dra. Carmen de Mendoza Fernández

Doctora en CC. Biológicas.

Laboratorio de Biología Molecular.

S^o de Enfermedades Infecciosas.

Hospital Carlos III, Madrid.

Dr. Vicente Soriano Vázquez

Doctor en Medicina.

Jefe de Sección.

S^o de Enfermedades Infecciosas.

Hospital Carlos III, Madrid.

V^oB de los directores de la Tesis

Madrid, 2012

Índice

Índice	5
Resumen	9
1. Introducción	13
1.1. Virología del XMRV.....	15
1.1.1. Retrovirus humanos.....	15
1.1.2. Estructura molecular del XMRV.....	17
1.2. Origen y transmisión del XMRV.....	22
1.3. Asociación con patología.....	27
1.3.1. XMRV en cáncer de próstata.....	27
1.3.2. XMRV en síndrome de fatiga crónica.....	29
1.4. Métodos de detección.....	34
1.5. Factores genéticos y su asociación con XMRV.....	37
1.6. Epidemiología del XMRV.....	40
2. Objetivos	43
3. Pacientes y métodos	47
3.1. Diseño del estudio	49
3.2. Pacientes.....	50
3.3. Obtención del plasma y de células mononucleares de sangre periférica.....	54
3.4. Ensayo serológico para XMRV.....	54
3.5. Extracción de ADN.....	57
3.6. Método de amplificación por PCR anidada de XMRV.....	57
3.7. Purificación del producto amplificado.....	60
3.8. Secuenciación de los fragmentos del genoma de XMRV (gag y env)...	60
3.9. Controles utilizados para el ensayo de PCR de XMRV	60

3.10. Ensayo de sensibilidad de XMRV.....	62
3.11. Clonación de productos de PCR.....	62
3.12. Análisis filogenético de secuencias.....	64
3.13. Método de amplificación por PCR a tiempo real de RNasa L.....	65
3.14. Análisis estadístico.....	65
4. Resultados	67
4.1. Estudio de prevalencia de infección por XMRV en diferentes grupos de población.....	69
4.1.1. Características de la población estudiada.....	70
4.1.2. Reactividad serológica para anticuerpos frente a XMRV.....	75
4.1.3. Ensayo de PCR para la detección de XMRV.....	79
4.1.3.1. Control positivo.....	79
4.1.3.2. Control negativo.....	79
4.1.3.3. Ensayo de sensibilidad de XMRV.....	80
4.1.3.4. Secuencias genéticas de XMRV.....	80
4.2. Estudio de distribución alélica de R462Q en RNasa L.....	84
4.2.1. Distribución alélica de R462Q en RNasa L.....	85
5. Discusión.....	89
5.1. Reactividad serológica y amplificación genética de XMRV.....	92
5.2. Características de la población de estudio para el estudio de distribución alélica de R462Q en RNASA L	107
6. Conclusiones.....	111
7. Bibliografía.....	115
8. Publicaciones surgidas durante esta tesis.....	135
9. Abreviaturas.....	139

Resumen

RESUMEN

En el año 2006 se identificó un nuevo retrovirus humano en pacientes con cáncer de próstata (CP). Se trata de un gammaretrovirus que, por su homología con el virus de la leucemia del ratón, se ha denominado XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus). A finales del año 2009 se publicó en la revista Science un artículo en el que se relacionaba la infección por XMRV con el síndrome de fatiga crónica (SFC). Se comunicó la presencia de XMRV en más de dos terceras partes de los pacientes analizados. Estudios posteriores en grupos de población similares han arrojado resultados muy variables, con prevalencias que fluctúan entre el 0 y el 27% en CP y entre el 0 y el 67% en SFC.

El diagnóstico de la infección por XMRV adolece de importantes dificultades metodológicas, lo que impide conocer con certeza los mecanismos de transmisión, las poblaciones afectadas y su posible papel etiológico en diferentes patologías.

En esta tesis nos planteamos estudiar la presencia de infección por XMRV en diferentes grupos de población, utilizando tanto métodos serológicos (ELISA y Western Blot) como moleculares (PCR y secuenciación).

De forma secundaria, analizamos el impacto de una mutación en el gen de la RNasa L (R462Q), que se ha postulado podría aumentar la susceptibilidad a infecciones víricas, entre ellas la ocasionada por XMRV en pacientes con cáncer de próstata.

Seleccionamos un total de 1.103 muestras de pacientes con SFC y/o fibromialgia (FM) (437), CP (69), VIH-1 (149), HTLV-1/2 (31), hepatitis crónica

B (VHB) (81), hepatitis crónica C (VHC) (72), enfermedades autoinmunes (18) y un grupo control de 246 donantes de sangre.

Se analizó la presencia de anticuerpos frente a las proteínas p15E y gp70 del XMRV utilizando una prueba de ELISA y un WB prototipo diseñado por Abbott. Además, se estudió la presencia de secuencias gag y/o env del virus en muestras de células mononucleares de sangre periférica.

Un total de 3 muestras (0,3%) fueron serorreactivas para p15E (2 HTLV-1 y 1 VHC), 15 (1.4%) para gp70 (6 SFC, 4 donantes sanos, 2 VIH-1, 1 CP, 1 VHB y 1 VHC). Únicamente se obtuvo un resultado positivo para fragmentos de gag por PCR en un paciente con CP. En una segunda muestra no pudo confirmarse este resultado.

El estudio de cambios en la posición 462 del gen que codifica para la RNasa L se realizó en 383 pacientes (71 VIH-1, 15 VHB, 18 HTLV-1, 65 CP, 107 SFC y 105 donantes sanos). La frecuencia alélica en la posición R462Q fue la siguiente: 33.7% RR, 49.9% RQ y 16.4% QQ. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes o controles.

1. Introducción

1.1. VIROLOGÍA DEL XMRV

1.1.1. Retrovirus humanos

La familia *Retroviridae* es un grupo grande y diverso de patógenos humanos y animales que causan una gran variedad de enfermedades incluyendo muchos tipos de cáncer y varias enfermedades inmunológicas y neurológicas (Weiss et al., 1984; Goff, 2000; Coffin et al., 1997). Los retrovirus han sido ampliamente estudiados en los últimos años. Se encuentran distribuidos entre los vertebrados, infectando fundamentalmente a mamíferos y aves. Los 4 retrovirus más importantes identificados hasta la fecha son el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) (Barré-Sinoussi et al., 1983), el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2) (Clavel et al., 1986), el virus linfotrópico humano de células T de tipo 1 (HTLV-1) (Poiesz et al., 1980) y el virus linfotrópico humano de células T de tipo 2 (HTLV-2) (Kalyanaraman et al., 1982). Los 2 primeros son los causantes de la gran pandemia del SIDA, mientras que el HTLV-1 se ha relacionado con síndromes linfoproliferativos como la leucemia de células T del adulto (ATLL) o una mielopatía denominada paraparesia espástica tropical (TSP). En cuanto al HTLV-2, se trata de un virus “en busca de enfermedad” puesto que no se ha demostrado hasta la fecha su papel etiológico en ninguna enfermedad.

En la clasificación taxonómica de los virus, la familia *retroviridae* tiene 7 géneros; alpha, beta, gamma, delta, lentivirus y spumavirus (Coffin et al., 1997). Los retrovirus identificados en humanos son deltaretrovirus (HTLV) y lentivirus (VIH). Los virus de la leucemia murina (MLV) son retrovirus perteneciente al género gamma-retrovirus

que causan cánceres y otras enfermedades en ratones, y se dividen en las clases ecotrópico, anfotrópico, politrópico, y xenotrópico en base al uso de los receptores. Algunos virus del género gamma-retrovirus producen leucemias y sarcomas en roedores, felinos y distintas especies de primates, si bien no se ha demostrado su implicación en cánceres humanos hasta el momento ([Rowe, 1973](#); [Gardner, 1978](#); [Levy, 1978](#); [Weiss et al 1982](#); [Weiss et al., 1985](#); [Coffin et al., 1989](#); [Stocking et al., 2008](#)).

En el año 2006, Urisman y colaboradores, identificaron un nuevo retrovirus, el virus relacionado con el virus de la leucemia murina xenotrópico (en inglés, *xenotropic murine leukemia virus-related virus*), XMRV, aislado a partir de muestras de tejido en pacientes con cáncer de próstata (CP) ([Urisman et al., 2006](#)). Los retrovirus xenotrópicos se descubrieron por primera vez en ratones. Presentan la característica de ser endógenos a las especies animales, es decir, están integrados en el genoma del animal, aunque no pueden reinfectar células de esa especie. Sin embargo, como su nombre lo indica (*xenos*, extranjero), estos virus pueden infectar a las células de otras especies animales. El virus de la leucemia murina xenotrópico (X-MLV), por ejemplo, infecta las células de varias especies incluyendo a los humanos, pero no puede infectar a muchas células de ratón ([Levy, 1973](#); [Levy, 1978](#); [Weiss et al., 1984](#); [Kurth et al., 2010](#)) [Baliji et al., 2010](#)).

Posteriormente, en el año 2009, Lombardi y colaboradores, aíslan el mismo virus en pacientes aquejados con síndrome de fatiga crónica (SFC) ([Lombardi et al., 2009](#)). Desde entonces se inicia una búsqueda activa de este virus en diferentes grupos de pacientes y países alrededor del mundo.

1.1.2. Estructura molecular del XMRV

XMRV presenta la morfología típica de los gamma-retrovirus tipo C con un core policlonal y un diámetro de 100 nm (Schlaberg et al., 2009). El genoma viral es un dímero lineal con polaridad positiva, cadena de ARN sencilla y con una longitud de 8.185 nucleótidos (Urisman et al., 2006). Presenta 3 marcos de lectura que codifican para las poliproteínas gag, pol y env. El gen *gag* da lugar a las proteínas del core que incluye la matriz, la cápside, la nucleocápside y p12; *pol* da lugar a la proteasa (PRO), retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN); y *env* a las proteínas de la envuelta: subunidad de superficie (gp70) y subunidad transmembrana (p15E) (Figura 1).

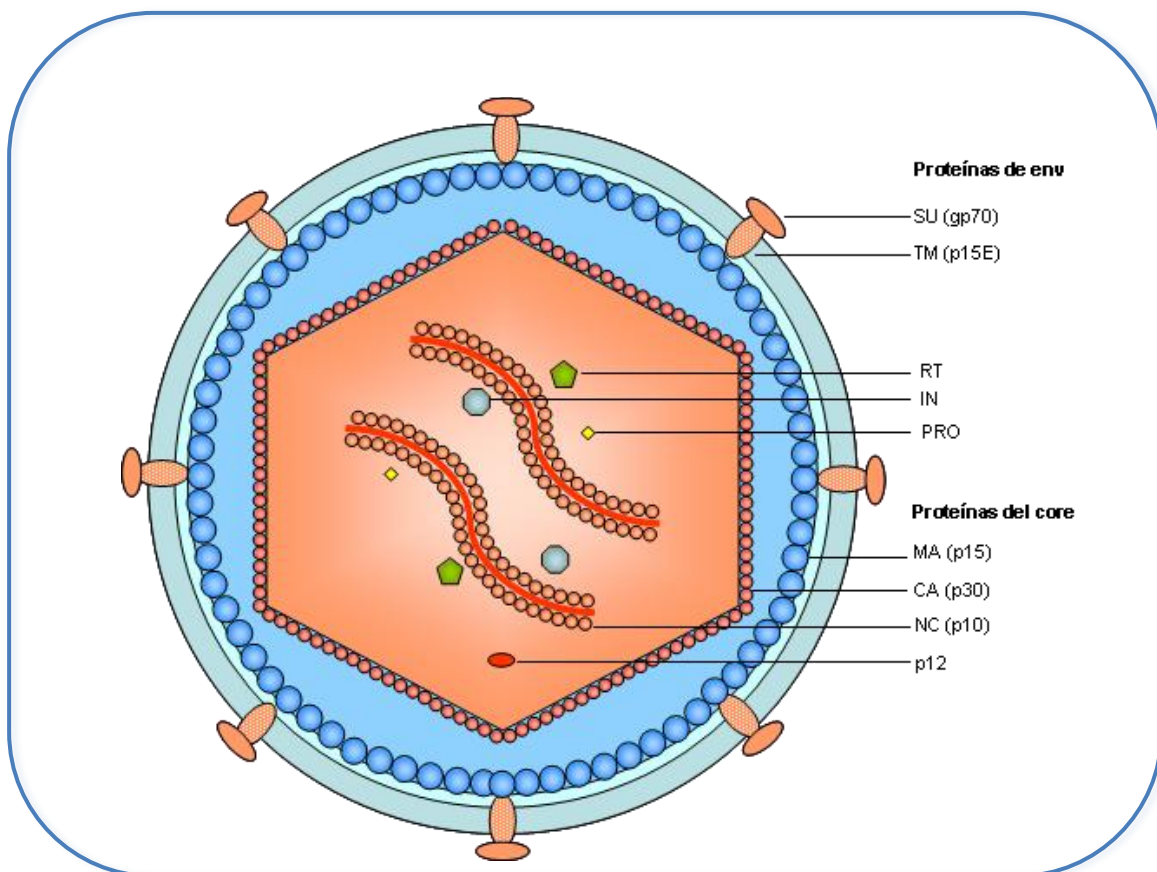


Figura 1. Estructura de XMRV. Las 2 copias del genoma ARN de polaridad positiva se encuentran asociados a la proteína NC (nucleocápside), y están a su vez encapsidadas junto con el resto de proteínas codificadas por *gag* [matriz (MA), cápside (CA) y p12]; y las enzimas virales codificadas por *pol* [retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PRO)]. La envuelta del virus contiene las proteínas de la envuelta gp70 (subunidad de superficie, SU) y p15E (subunidad transmembrana, TM).

Con un genoma de longitud similar a otros retrovirus, presenta una estructura relativamente sencilla, ya que carece de proteínas accesorias o genes reguladores, a diferencia de otros retrovirus humanos como son el VIH o HTLV (**Figura 2**) (Groom et al., 2010b; Paprotka et al., 2010).

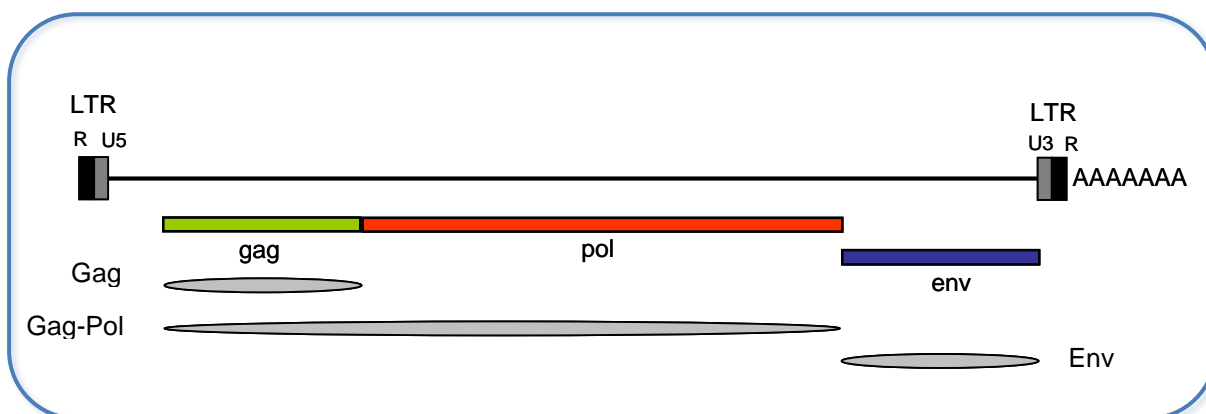


Figura 2. Organización genómica de XMRV. Las proteínas estructurales virales (MA, p12, CA, y NC) y las enzimas (proteasa, la transcriptasa inversa y la integrasa) se derivan del procesamiento proteolítico de las poliproteínas de Gag y Gag-Pol. Las glicoproteínas SU y TM surgen después de la formación de Env.

En la tabla 1 se resumen las características genéticas y moleculares de los retrovirus humanos identificados hasta el momento (Tabla 1).

Tabla 1. Características genómicas de los retrovirus humanos.

	VIH-1	VIH-2	HTLV-1	HTLV-2	XMRV
Género	Lentivirus	Lentivirus	Deltaretrovirus	Deltaretrovirus	Gammaretrovirus
Longitud del genoma	9800 nt (aproximadamente)	9671 nt	9032 nt	8932 nt	8185 nt
Proteínas de la env	gp160, gp120, gp41	gp140, gp105, gp36	gp46, gp21	gp46, gp21	gp70, p15E
Proteínas del core	p55, p24, p17	p55, p26, p15	p19, p24, p15	p19, p24, p15	p15, p30, p10
Enzimas	Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa	Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa	Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa	Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa	Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa
Genes accesorios	tat, nef, vif, vpr, vpu	tat, nef, vif, vpr, vpx	pX	pX	Ninguno
Tropismo	CCR5, CXCR4	CCR5, CXCR4, CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4	Transportador GLUT-1	Transportador GLUT-1	XPR1

A pesar de su semejanza con virus xenotrópicos, XMRV es distinto de todos los MLV xenotrópicos descritos hasta la fecha puesto que presenta una delección de 24 nucleótidos en *gag* y una de 2 nucleótidos en el LTR. Debido a que la diversidad de los retrovirus depende de los errores en los ciclos de replicación viral, la falta de variabilidad genética observada en XMRV sugiere podría tratarse de un virus que se perpetua a través de una expansión clonal de células que infecta, (Kearney et al., 2010), tal y como sucede en la infección por HTLV-1/2 y que es claramente diferente del VIH (Figura 3).

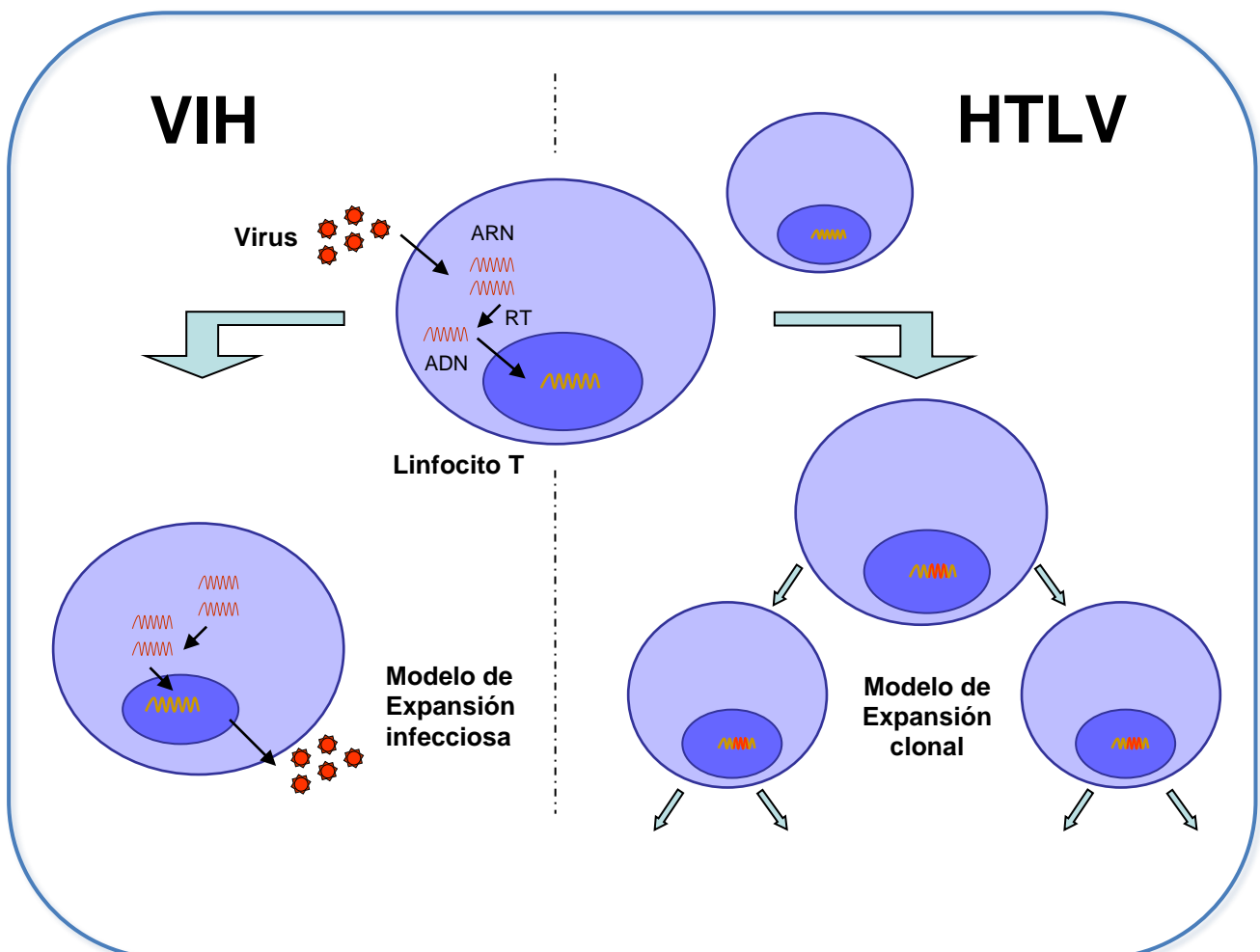


Figura 3. Modelo de replicación viral del VIH y modelo de expansión clonal de HTLV

El tropismo del virus está determinado en gran medida por los receptores celulares de superficie, por el cual las glicoproteínas de envoltura viral se unen antes de la entrada del virus en la célula ([Bhosle et al., 2010](#)).

Virus similares a XMRV están presentes en la línea germinal de los ratones, pero sus proteínas de la envuelta carecen de un receptor en las células murinas. XMRV puede unirse a los receptores celulares presentes en otras especies, incluyendo los humanos ([Levy et al., 1999](#); [Coffin et al., 2009](#)). Urisman et al., basándose en la similitud general de las envoltas xenotrópicas, predijo que el receptor para XMRV es XPR1 (SYG1), un receptor identificado para MLV xenotrópico y politrópico ([Urisman et al., 2006](#); [Battini et al., 1999](#); [Tailor et al., 1999](#); [Menéndez-Arias, 2011](#)). Este receptor es una proteína de expresión ubicua en la superficie celular en numerosas células humanas como células epiteliales prostáticas o células del estroma, y también en animales ([Hong et al., 2009](#)). Aunque XMRV fue originalmente descrito en infección de las células del estroma prostático ([Urisman et al., 2006](#)), en ensayos in vitro muestran que el virus puede infectar y replicarse en varias líneas celulares humanas (HeLa, 293T, Du145, entre otras), bovina, de ratón salvaje, visón y mono ([Stieler et al., 2010a](#)).

1.2. ORIGEN Y TRANSMISIÓN DEL XMRV

La transmisión directa de los virus de los roedores salvajes a los seres humanos no es rara. Por ejemplo, *Hantavirus* y *Arenavirus* de roedores son propagados a través de excrementos o aerosoles y son capaces de infectar especies de no roedores, incluidos los seres humanos (Hart y Bennett, 1999; Klein y Calisher, 2007; Charrel y de Lamballerie, 2010). En los últimos años, estos virus han producido brotes epidémicos importantes (Padula et al., 1998; Zhang et al., 2010b; Tersago et al., 2011). Sin embargo, los diferentes hantavirus se limitan generalmente a un huésped o reservorio en particular y su distribución geográfica determina la distribución de los virus y las enfermedades humanas que producen (Hart y Bennett, 1999).

Como sugiere su nombre, XMRV pudo originarse en ratones y es el primer agente de su clase en ser identificado en seres humanos. Cada genoma del ratón contiene múltiples copias del MLV endógeno y por lo tanto tiene la capacidad de expresar ARN viral y, posiblemente, partículas virales.

La transmisión zoonótica de estos virus podría haber ocurrido en los muchos millones de años que los ratones y los hombres han compartido el mismo ambiente. Sin embargo, las secuencias actuales de los aislados de XMRV de muestras humanas son muy similares a las secuencias genómicas del ratón, lo que sugiere un bajo número de ciclos de replicación desde la transmisión zoonótica, por lo que es más probable que el salto efectivo de ratones a humanos sea reciente (Van der Kuyl et al., 2011).

Otras teorías sobre su origen intentan explicar que evolucionó como resultado de un evento de recombinación entre MLV politrópico y xenotrópico, aunque se desconoce si se trató de un único o múltiples saltos inter-especies o cuándo se dieron estos saltos zoonóticos.

Los gammaretrovirus, como XMRV, son capaces de pasar a especies de taxones muy diferentes (**Figura 4**). Por ejemplo, un virus de los roedores del sudeste asiático ha saltado a los gibones y los koalas ([Kurth et al., 2010](#); [Voevodin et al., 2009](#)). Debido a nuestra frecuente proximidad con ratones, la infección de los seres humanos por retrovirus murinos no es improbable ([Weiss, 2010](#)).

Agentes similares se han encontrado en un amplio número de especies animales que incluye retrovirus endógenos porcinos, virus de la leucemia felina o virus de la leucemia del gibón ([Maeda et al., 2008](#)).

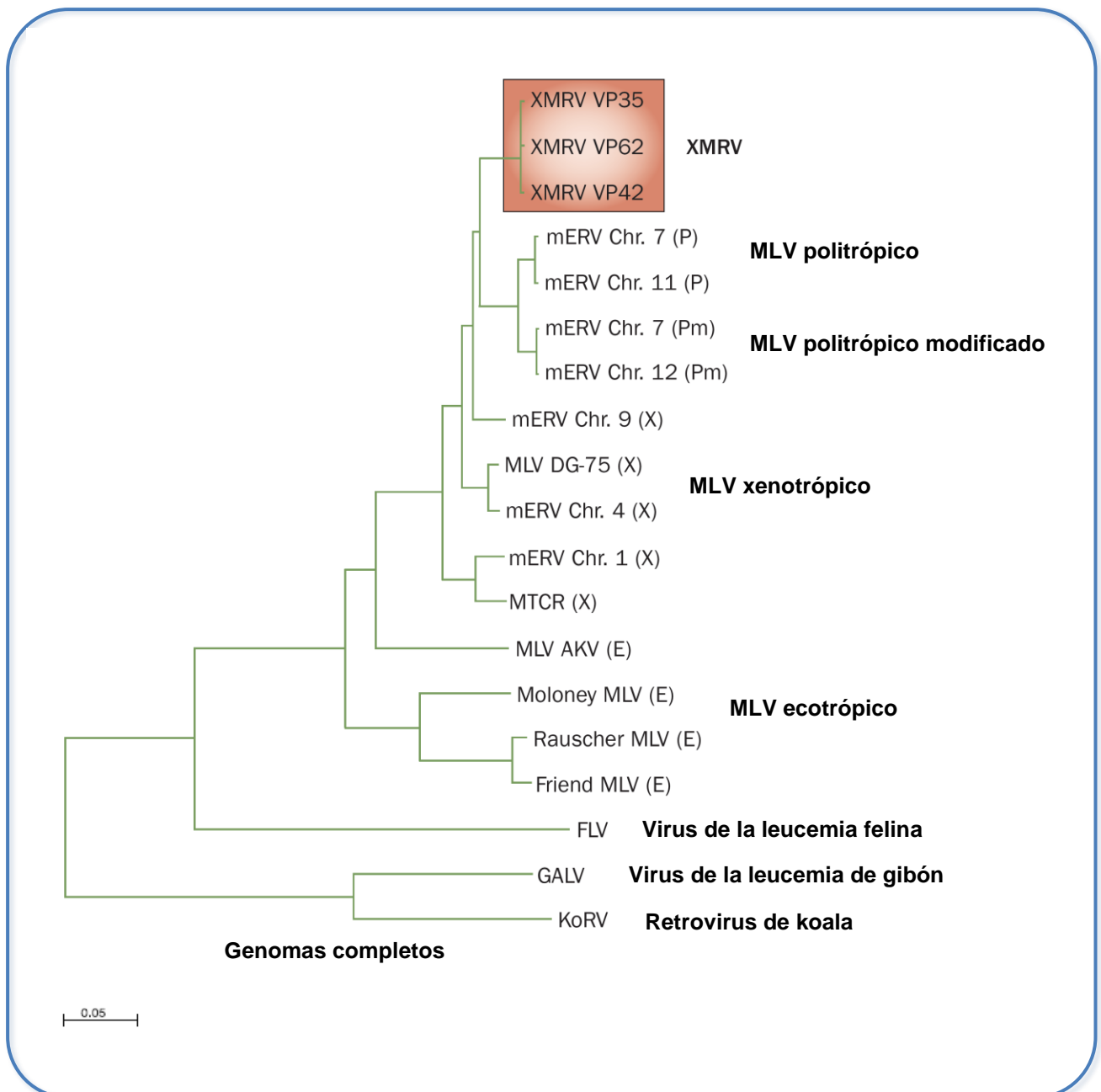


Figura 4. Análisis filogenético de XMRV en base a secuencias del genoma completo (Urisman et al., 2006; Adaptado de Silverman et al., 2010). Genomas completos de XMRV VP35, VP42, VP62 (rojo); virus de la leucemia felina (FLV); retrovirus de koala (KoRV); virus de la leucemia de gibón (GALV); y una serie de provirus representativos no-ecotrópicos (mERVs). Las secuencias están etiquetadas como xenotrópico (X), politrópico (P), modificado politrópico (Pm), o ecotrópico (E).

Independientemente del mecanismo de transmisión de XMRV de especies de ratones a los seres humanos, la posible propagación entre humanos podría suponer una amenaza para la salud pública. Puesto que es un retrovirus las principales vías de transmisión que se han postulado son las mismas que para VIH y HTLV, sexual, parenteral y vertical. Inicialmente, la transmisión sexual fue propuesta como posible vía ([Hong et al., 2009](#)), aunque XMRV no fue detectado en plasma seminal de pacientes infectados por VIH ([Cornelissen et al., 2010](#)). Posteriormente, se sugirió que XMRV podía ser transmitido por la saliva al detectarse fragmentos de XMRV en el tracto respiratorio, aunque las concentraciones de ARN fueron bajas ([Fischer et al., 2010](#)). Otra posible vía podría ser la transmisión a través de productos sanguíneos ya que como virus infeccioso fue cultivado a partir de células de la sangre ([Lombardi et al., 2009](#)). Por otra parte, la infección por XMRV podría suponer un riesgo para los receptores de transfusiones y trasplantes. Teniendo en cuenta que el XMRV es un retrovirus y parece estar presente en células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) y en el plasma sanguíneo, su transmisión podría ser posible a través de transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos de donantes portadores ([Klein et al., 2011](#)). Esta posibilidad se apoya en que las células humanas se han infectado en el laboratorio por virus encontrados en muestras humanas, y por la transmisibilidad de la transfusión de otros retrovirus como por ejemplo, el VIH-1, VIH-2, HTLV-1 o HTLV-2 ([Lombardi et al., 2009](#)). Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia de transmisión entre humanos por ninguna de las vías anteriormente mencionadas quedando la duda sobre cual o cuales son las vías de transmisión del XMRV. En la tabla 2 se enumeran los diferentes estudios que han tratado de dilucidar las vías de transmisión de XMRV

Tabla 2. Análisis de las posibles vías de transmisión de XMRV en humanos.

	Estudio	Individuos analizados	Muestra o tejido	Resultados	Conclusión
Modelo Animal	Sharma et al., 2011	5 <i>macaco rhesus</i>	Tracto reproductivo femenino y masculino	Detección de XMRV en individuos macho y hembra	Detección de XMRV en el tracto reproductivo de los macacos machos y hembras infectados por vía intravenosa que sugiere su posible transmisión sexual
Sexual	Hong et al., 2009	Pacientes varones	Tejido prostático	Se detectó XMRV en las secreciones prostáticas de algunos hombres con CP	Potencial mecanismo biológico para su transmisión sexual
Vertical	Sakuma et al., 2012	Ratones (<i>Mus pahari</i>)	Células sanguíneas	No hay viremia en la descendencia	Baja incidencia de transmisión vertical
Transfusión (Donantes)	Lombardi et al., 2009	Pacientes con SFC y controles sanos	Células sanguíneas	2/3 de 101 pacientes con SFC; 4% de 218 controles sanos	Células humanas infectadas en el laboratorio por XMRV encontrados en muestras humanas

También ha sido fuente de controversia el uso de xenotrasplantes. Algunos de los retrovirus endógenos porcinos (PERVs) que se encuentran en el genoma de todos los cerdos, pueden ser virus infecciosos e infectar células humanas en cultivo. Al estar estrechamente relacionadas PERVs con XMRV, podrían ocurrir fenómenos de recombinación entre los virus, por lo que antes del xenotrasplante los beneficiarios deberían ser testados para XMRV (Denner, 2010).

1.3. ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍA

1.3.1. XMRV en cáncer de próstata

Respecto al CP y XMRV, existe la creciente vinculación de agentes infecciosos con distintas neoplasias, según datos aportados por estudios epidemiológicos, genéticos y moleculares. La mayoría de los agentes infecciosos causantes de cáncer son virus. Es el caso del virus de la hepatitis crónica B (VHB) y virus de la hepatitis crónica C (VHC), que pueden producir hepatocarcinoma; HHV8, que es el agente causal del sarcoma de Kaposi; HPV, asociado al cáncer cervical y anal; o HTLV, ligado a la leucemia de células T del adulto (Maeda et al., 2008; Fan, 2007; Klein et al., 2008; Gjoerup et al., 2010; Tsai et al., 2010).

El CP es el segundo cáncer más común en varones, y la segunda causa principal de muerte por neoplasia en varones (Cheng et al., 2010). La enfermedad se desarrolla más frecuentemente en individuos mayores de 50 años. Se estima que el riesgo es de 1 por cada 6 varones, con una mortalidad global del 3%.

Se han establecido algunos factores de riesgo para desarrollar CP como son la edad, raza, nacionalidad, dieta, obesidad, historia familiar, tabaco o agentes infecciosos, especialmente los transmitidos por vía sexual ([Sarma et al., 2006](#); [Sutcliffe et al., 2006](#)). Las infecciones virales pueden ser factores desencadenantes del proceso inflamatorio. Sin embargo, los estudios epidemiológicos diseñados para detectar una posible relación entre las infecciones virales y el CP no han sido concluyentes ([Dillner et al., 1998](#); [Strickler et al., 1998](#); [Tavtigian et al., 2001](#); [Zambrano et al., 2002](#); [Samanta et al., 2003](#); [Korodi et al., 2005](#); [Das et al., 2008](#); [Sfanos et al., 2008](#)).

Tras una búsqueda activa de la relación de un virus y el CP, es en el año 2006 cuando se detecta la primera evidencia de XMRV en una cohorte de pacientes con CP en EEUU. En este estudio pionero, en el que se realizó una búsqueda activa de ácidos nucleicos virales en muestras de tejido de CP, concluyó con la identificación de XMRV en un 10% de los pacientes analizados ([Urisman et al., 2006](#)). Otro estudio posterior analizó tanto muestras de pacientes con CP como controles sanos y confirmaron una clara asociación del XMRV con CP, especialmente en aquellas formas tumorales más agresivas ([Schlaberg et al., 2009](#)).

La caracterización molecular y biológica de XMRV proporcionó posibles evidencias en el papel de este retrovirus en enfermedades humanas. Células humanas, especialmente células prostáticas, podrían ser altamente susceptibles a una infección de un clon de XMRV ([Dong et al., 2007](#); [Kim et al., 2008](#); [Knouf et al., 2009](#); [Rodríguez et al., 2010](#)).

Sin embargo, estudios posteriores realizados en amplias series de pacientes con CP en Alemania, Holanda, EEUU o México no lograron encontrar asociación de XMRV y CP ([Fischer et al 2008](#); [Verhaegh et al., 2010](#); [Sfanos et al, 2008](#); [Hohn et al., 2009](#); [Martinez-Fierro et al, 2010](#)).

1.3.2. XMRV en síndrome de fatiga crónica

El SFC es una entidad debilitante, de etiología desconocida y que se estima podría afectar a más de 15 millones de personas a nivel mundial ([Avellaneda et al., 2009](#)). Los diversos nombres que se han asignado a esta condición reflejan las hipótesis, tan numerosas como controvertidas, sobre su etiología. En general subyacen varios aspectos comunes. Es a menudo un cuadro post-infeccioso, también se relaciona con trastornos inmunitarios leves, y muchas veces se acompaña de trastornos neuropsicológicos y/o depresión.

El SFC es dos veces más frecuente en mujeres que en varones; en general los pacientes tienen entre 25 y 45 años de edad, aunque se han descrito casos en la infancia y en etapas posteriores de la vida. Se han identificado casos en todos los países desarrollados. La estimación de la prevalencia del SFC ha variado según la definición de caso y el método utilizado. En Estados Unidos se ha llegado a estimar una frecuencia de 100 a 300 personas por cada 100.000 habitantes, utilizando los criterios diagnósticos de los CDCs. En otros estudios de cohortes de Estados Unidos se ha estimado que la proporción de adultos afectados oscilaría entre el 0.5 al 2% ([Jason et al., 1999](#); [Reeves et al., 2007](#)).

Dado que algunos de los síntomas que caracterizan el SFC se parecen a los de las enfermedades infecciosas, muchos estudios han investigado la posible etiología viral en el SFC. En los últimos 25 años se ha vinculado el SFC con infecciones agudas o persistentes por el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, diferentes enterovirus, Herpes virus tipo 6, etc. Sin embargo, no ha podido demostrarse de forma definitiva una asociación causal con ningún agente infeccioso ([Khan et al., 1993](#); [DeFreitas et al., 1991](#); [Afari et al., 2003](#); [Devanur et al., 2006](#); [Heneine et al., 1994](#); [Zhang et al., 2010a](#)).

En un artículo de referencia publicado en la revista Science en octubre de 2009 por un grupo de investigadores americanos, se comunicó que había secuencias de XMRV en dos terceras partes de una serie de 101 pacientes con SFC. Además presentaban secuencias de XMRV un 4% de los 218 controles sanos analizados ([Lombardi et al., 2009](#)). Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron muestras de pacientes presentes en el biobanco de tejidos de una cohorte bien caracterizada de pacientes con SFC del Instituto Nacional Whittemore Peterson de EEUU (WPI). Fueron seleccionados al cumplir los criterios del CDC (Fukuda, 1994) para el SFC y los Criterios de consenso canadienses para el SFC / encefalomiелitis miálgica (EM) de 2003 y que presentaban una discapacidad severa. Las muestras fueron seleccionadas de varias regiones de los Estados Unidos, donde los brotes de síndrome de fatiga crónica habían sido documentados. Se trataba de pacientes que habían sido vistos en las consultas médicas privadas, y su diagnóstico de SFC se basaba en la fatiga prolongada, la presencia de déficits cognitivos y alteraciones inmunológicas reproducibles. Además, se monitorizó a los pacientes durante un período prolongado de tiempo y se les documentó múltiples observaciones

longitudinales de las alteraciones clínicas y de laboratorio. El aislamiento de ARN y ADN se realizó mediante la extracción de la sangre de los sujetos por punción venosa utilizando procedimientos estandarizados. El plasma se recogió por centrifugación, se aspiró y se almacenó a -80°C para uso posterior. Además, se aislaron las CMSP por estratificación de la sangre diluida sobre Ficoll y su posterior centrifugación aspirando la capa de CMSP. Se almacenaron a -80°C para la extracción de ADN y ARN y su análisis. Para evitar posibles problemas de contaminación de ADN de laboratorio, la PCR se realizó con los reactivos por separado en una habitación separada del laboratorio e incluyeron controles negativos en cada experimento. Además, la identificación de los genes gag y env de XMRV se realizó por PCR en reacciones separadas. La amplificación por PCR para la secuenciación de genomas de XMRV de larga longitud se realizó en ADN amplificado por PCR anidada utilizando ADN de CMSP.

En este estudio, de 101 muestras de pacientes con SFC, 68 (67%) contenían secuencias de gag de XMRV mediante ensayos de PCR anidada. Su detección fue confirmada en 7 de 11 muestras de SFC en el Cleveland Clinic (EEUU) mediante amplificación por PCR y secuenciación de fragmentos de env XMRV (352 nt) y de gag (736 nt) en ADN de CMSP de pacientes con SFC. Por otra parte, se detectaron en 8 de 218 (3.7%) secuencias de gag en ADN de CMSP de individuos sanos. En todos los casos positivos, tanto con secuencias de gag y env de XMRV, se demostró una alta homología genética entre las secuencias de XMRV obtenidas de muestras de pacientes con SFC y las secuencias obtenidas a partir de muestras de tejido de CP del estudio de Urisman y cols. (VP62, VP35 y VP42). Por tanto, se concluyó que se trataba del mismo agente infeccioso que el descrito por Urisman y cols en 2006.

Al diferir en 6 nucleótidos las secuencias generadas de XMRV de pacientes con SFC y con CP sugieren que fueron infecciones independientes, y todas las secuencias analizadas y comparadas entre pacientes con SFC y CP superaban una homología de más de 99%. Para excluir la posibilidad de contaminación de laboratorio por MLV, realizaron análisis filogenéticos entre secuencias de MLV, XMRV de CP y XMRV de pacientes SFC. Las secuencias de XMRV obtenidas de pacientes con SFC se agruparon con secuencias de XMRV de las encontradas en los casos de CP, formando una rama distinta las secuencias pertenecientes a MLV de cepas puras de ratón. Es por ello que concluyeron que sería improbable que los virus detectados en muestras de sangre de pacientes con SFC fueran debido a contaminación.

Además de evidencias por PCR, el estudio mostró múltiples líneas de evidencia por aislado viral y detección de anticuerpos específicos. De esta manera se demostró presencia de secuencias de XMRV y proteínas en CMSP y la presencia de virus transmisibles de células libres en plasma de pacientes. Además, experimentos que realizaron en cultivo celular revelaron que XMRV derivados de pacientes eran infecciosos y que la transmisión del virus en células asociadas y en células libres era posible. Para determinar si las proteínas de XMRV eran expresadas en CMSP de los pacientes con SFC analizados, desarrollaron ensayos de citometría de flujo intracelular y de WB utilizando anticuerpos específicos para XMRV. 19 de 30 muestras de pacientes con SFC fueron reactivos con anticuerpos monoclonales de rata a p30 gag de MLV. Por el contrario, 16 cultivos de CMSP de controles sanos analizados fueron negativos. Estos resultados fueron confirmados por WB usando MLV xenotrópico y p30 gag de MLV, entre otros.

Además, analizaron mediante χ^2 de Pearson las frecuencias en casos de SFC frente a controles sanos que fueron positivos y negativos para secuencias de XMRV. Este análisis sugirió que había asociación no aleatoria entre XMRV y pacientes con XMRV.

Por otra parte, investigaron si las proteínas virales detectadas en CMSP de pacientes con SFC reflejaban una infección por XMRV. Para ellos, linfocitos activados fueron cocultivados con LNCaP, línea celular de CP que presentaba deficiencias en la vía RNasa L y que previamente había mostrado ser sensible a la infección por XMRV. Después del cocultivo, las células LNCaP expresaron env y múltiples proteínas gag de XMRV analizados por WB y citometría de flujo intracelular.

Para conocer si XMRV generaba una respuesta inmune en pacientes con SFC, desarrollaron un ensayo de citometría de flujo que permitía detectar anticuerpos frente a env de XMRV. El plasma de 9 de 18 pacientes con SFC fueron reactivos, mientras que el plasma de 7 controles sanos no lo fueron, considerando que estos resultados eran consistentes con la hipótesis de que pacientes con SFC presentaban respuesta inmune frente a XMRV.

1.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Existe una gran controversia sobre cuál es el mejor método de detección de XMRV debido a la ausencia de métodos estandarizados hasta el momento. Los trabajos más importantes basan su detección mediante PCR (RT-PCR, PCR anidada o PCR a tiempo real), métodos serológicos como ELISA y Western Blot (WB), inmunohistoquímica, microarrays, hibridación in situ con fluorescencia (FISH), respuesta inmune o cultivo viral. Por otra parte, XMRV se ha estudiado en distintos tipos de células o tejidos analizados, como tejido prostático, células epiteliales, células T o B, CMSP, plasma o sangre total (**Tabla 3**).

En cuanto a los ensayos serológicos, el grupo de Hackett y cols. proporcionó la primera demostración de patrones de seroconversión inducidos por la infección por XMRV, caracterizándose la cinética de la respuesta de anticuerpos a XMRV en *macaco rhesus*. Se identifican marcadores serológicos útiles para la detección de la infección por XMRV mediante tres inmunoensayos prototipo para detectar anticuerpos específicos frente XMRV (gp70, p15E y p30), demostrándose una buena sensibilidad y especificidad (Qiu et al., 2010). Por otra parte, investigadores del CDC desarrollaron ensayos de WB para anticuerpos monoclonales y policlonales de XMRV, así como un ensayo ELISA empleando proteínas recombinantes de gag y env de XMRV (Switzer et al., 2010).

En relación a la detección por PCR, numerosos ensayos se han llevado a cabo con diferentes técnicas y para la amplificación de distintas regiones. Estudios importantes se basan en la detección por PCR anidada de *gag* de tejido prostático o de CMSP. Estos ensayos fueron desarrollados por los investigadores que identificaron el virus y por el primer grupo que lo asoció a SFC ([Urisman et al., 2006](#); [Lombardi et al., 2009](#)). Schlaberg y col. utilizaron PCR cuantitativa de la integrasa ya que es una región altamente conservada (cerca del 100%) para las secuencias de los aislados más importantes descritos (VP35, VP42 y VP62) pero compartiendo solamente el 80-85% de similitud con retrovirus murinos parecidos. Otras regiones han sido utilizadas para la detección de XMRV como *env* o *pol*.

Como control positivo se han utilizado principalmente dos variantes. La primera, una línea celular humana de carcinoma de próstata conocida como 22Rv1 y que se ha demostrado que contiene múltiples copias de XMRV integrado ([Knouf et al., 2009](#)). Otros grupos optan el uso de un plásmido en el que se inserta el aislado VP62 de XMRV desarrollado por R. Silverman ([Urisman et al., 2006](#)).

Tabla 3. Métodos de detección utilizados para la detección de XMRV.

	Estudio	Nº de muestras	Tipo de muestra	Porcentaje de detección
ELISA	Hohn (2009)	589	Suero	0
	Qiu (2012)	1000	CMSP, plasma	0-0.6
WB/hibridación	Switzer (2010)	51	Plasma	0
	Switzer (2011)	162	Plasma	0
Anticuerpos neutralizantes	Arnold (2010)	40	Suero	27.5
	Groom (2010a)	28	Suero	3.6
PCR	Fischer (2008)	87	Tejido prostático	0.4
	Sfanos (2008)	30	Tejido prostático	0
	Lombardi (2009)	101	CMSP	67
	Schlaberg (2009)	334	Cls epiteliales	27
	Furuta (2009)	-	CMSP	6
	Hohn (2009)	589	Tejido prostático	0
	Danielson (2010)	144	Tejido prostático	22
	Mi (2010)	391	CMSP	0
	Verhaegh (2010)	74	Tejido prostático	4
	Martinez-Fierro (2010)	55	Tejido prostático	0
	Switzer (2010)	50	CMSP	0
	Henrich (2010)	32	CMSP	0
	Van Kuppeveld (2010)	32	CMSP	0
	Erlwein (2010b)	186	Sangre total	0
	Groom (2010a)	142	CMSP	0
	Hong (2010)	65	CMSP	0
	Cornelissen (2010)	54	Plasma seminal	0
	Akgül (2012)	85	Tejido prostático	0
	Switzer (2011)	162	Tejido prostático	1.9
	Tang (2011)	268	Plasma y CMSP	0
FISH	Urisman (2006)	164	Tejido prostático	10

1.5. FACTORES GENÉTICOS Y SU ASOCIACIÓN CON XMRV

RNasa L

La primera evidencia de XMRV fue en una cohorte de pacientes con CP en EEUU, asociándose a anomalías en la enzima RNasa L, enzima que participa en mecanismos de respuesta innata antiviral e involucrada en la eliminación de agentes infecciosos a nivel celular. En concreto, a una mutación en homocigosis en RNasa L (R462Q), y que se asocia a presentar mayor riesgo de infección por el virus y un posible potencial oncogénico ([Urisman et al., 2006](#)).

El gen de la RNASEL codifica para la endoribonucleasa L, también llamada RNasa L. Pertenece a la familia de las ribonucleasa, las cuales se encuentran distribuidas en todos los tejidos y participan en diversos aspectos del metabolismo del ARN y su degradación. La enzima RNasa L es una nucleasa inusual y presenta 741 aminoácidos. Se expresa en tejido prostático, timo, bazo, testículos y colon. Es un efector del sistema 2-5A/RNasa L y representa una importante vía enzimática implicada en el mecanismo molecular del interferón (IFN).

Es una enzima fundamental en el mecanismo de defensa celular innata inducida por los interferones tipo I durante las infecciones virales. Una de sus funciones que mejor se conoce es la supresión de las infecciones virales mediante la regulación de la expresión tanto del RNA viral como celular.

RNasa L juega un papel determinante en la actividad antiviral contribuyendo a la inmunidad innata, y en la actividad antiproliferativa del IFN influyendo en el metabolismo celular (Austin et al., 2005; Bisbal et al., 2007; Klein et al., 2008; Scherbik et al., 2006). Además, presenta un complejo mecanismo de regulación. Como enzima inactiva está presente en casi todas las células de mamíferos y en ausencia de infección, la proteína podría mantenerse latente en el citoplasma. El IFN induce la expresión de la sintetasa 2-5A activándose en presencia de ARN de doble cadena, estructuras que producen muchos virus. Tras esto, se convierte el ATP en pequeños oligómeros conocidos como 2-5A (Hovanessian et al., 2007). Por último, la activación de la RNasa L en estado latente requiere la unión a una cadena corta de oligonucleótidos 2-5A.

Otra de las funciones que se atribuyen a la vía 2-5A/RNasa L es su implicación en la mediación de la apoptosis en respuesta a infecciones virales y a otros estímulos externos. La activación de RNasa L lleva a la apoptosis a través de mecanismos de degradación de ARNr 28S y 18S y del ARNm mitocondrial produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas y una pérdida de potencial de la membrana mitocondrial. Esto provoca la liberación osmótica y la inflamación del citocromo c. Variantes alélicas en el gen RNASEL hace que la actividad funcional de RNasa L esté disminuida, permitiendo escapar a las células tumorales de la vía apoptótica y, por tanto, facilitando el desarrollo del proceso tumoral.

Estudios recientes han sugerido que la RNasa L podría tener un papel importante en la biología del cáncer con una función supresora de tumores. Estos hallazgos se han demostrado principalmente en estudios genéticos del CP hereditario.

Existen polimorfismos genéticos que se han asociado fuertemente a la posibilidad de desarrollar cáncer. En concreto, a una mutación en homocigosis en RNasa L (R462Q) (Rennert et al, 2005; Breyer et al., 2009; Rökman et al., 2002). Un estudio muestra que el 13% en pacientes con CP presentan QQ. Por otra parte, se ha visto que QQ reduce 3 veces la actividad catalítica de RNasa L comparada con RR (alelo salvaje) (Casey et al., 2002). Urisman y cols. asocian la presencia de XMRV en CP y a anomalías en la enzima RNasa L, concretamente a la mutación en homocigosis en RNasa L R462Q, asociándose a presentar mayor riesgo de infección por el virus y un posible potencial oncogénico. Este estudio mostró que el 10% de los pacientes con CP presentaban XMRV (Urisman et., 2006). XMRV se detectó en 8/20 (40%) R462Q en homocigosis QQ en tejidos de CP, y en 1/66 (1,5%) con alelo salvaje. Posteriormente se demostró una clara asociación del XMRV con el CP, especialmente en aquellas formas tumorales más agresivas (Schlaberg et al., 2009), aunque no asociándolo a anomalías en la RNasa L. Además de haberse relacionado la enzima RNasa L con la respuesta innata antiviral, esta enzima podría tener un papel importante en la biología del cáncer, en relación a anomalías genéticas (R462Q). Sus implicaciones en SFC, CP e infecciones virales han sido demostradas, aunque sigue siendo controvertida su posible asociación a la infección por XMRV. Por último, XMRV, al igual que otros MLV xenotrópicos, está sujeto a una severa restricción a través de la actividad de los factores antivirales. Se ha demostrado que los factores de restricción APOBEC3G, APOBEC3B y APOBEC3F, así como teterina, un inhibidor de la liberación de nuevas partículas, son capaces de bloquear la replicación de XMRV (Groom et al., 2010b; Paprotka et al, 2010; Stieler y Fischer, 2010b). Por el contrario, TRIM5 α que inactiva la entrada de cápsides virales, no tiene efecto en XMRV (Groom et al., 2010b; Paprotka et al, 2010).

1.6. EPIDEMIOLOGÍA

Es difícil describir la epidemiología y distribución de XMRV en estos momentos por varios motivos. En primer lugar, se trata de un virus de reciente descubrimiento. Los primeros datos sobre el mismo se publicaron en el año 2006 ([Urisman et., 2006](#)). En segundo lugar, no se han realizado hasta la fecha estudios amplios de vigilancia epidemiológica que puedan darnos una idea sobre la distribución de esta infección a nivel mundial y la población que podría estar infectada. En tercer lugar, no hay hasta el momento métodos diagnósticos fiables que permitan realizar este tipo de estudios epidemiológicos. Por último, las patologías con las que se ha asociado son claramente diferentes y esto dificulta la elección de la población diana que se debe analizar. Además, los datos publicados hasta la fecha son contradictorios. Mientras que los resultados de Lombardi y colaboradores sugieren una clara asociación con SFC (hasta un 67% de los pacientes con SFC) y una considerable prevalencia en población sana (~ 4%), otros trabajos no han podido reproducir estos resultados, ni en pacientes con SFC ni en población sana.

En la **Tabla 4** se recogen los estudios que se han realizado hasta el momento junto con el número de pacientes analizados y la tasa de infección observada. Es por tanto clave analizar diferentes poblaciones y controles en distintos países con el fin de poder definir la distribución epidemiológica de este nuevo retrovirus.

Tabla 4. Análisis de la presencia de XMRV en distintos grupos de pacientes y diferentes lugares geográficos. En la tabla se recoge el lugar de estudio, la población estudiada y los métodos de detección utilizados con el fin de reflejar las analogías y diferencias entre los distintos trabajos.

	País	Población	Prevalencia XMRV (%)	Método Diagnóstico	Tipo muestra	Referencia
Cáncer de próstata	EEUU	164	10	Microarrays, RT-PCR, FISH, IHC	Tejido prostático	Urisman (2006)
	EEUU	334	27	PCR, IHC	Células epiteliales	Schlaberg (2009)
	EEUU	40	27.5	Respuesta inmune, PCR, FISH	Suero, fibroblastos estromales	Arnold (2010)
	Japón		6	PCR, RT-PCR	CMSP	Furuta (2009)
	EEUU	144	22	PCR	Tejido prostático	Danielson (2010)
	Alemania	87	0.4	RT-PCR	Tejido prostático	Fischer (2008)
	Alemania	589	0	PCR, RT-PCR, ELISA	Tejido prostático, suero	Hohn (2009)
	Irlanda	9	0	RT-PCR	Tejido prostático	D'Arcy (2008)
	Holanda	74	4	PCR	Tejido prostático	Verhaegh (2010)
	EEUU	30	0	PCR	Tejido prostático	Sfanos (2008)
	México	55	0	PCR	Tejido prostático	Martinez-Fierro (2010)
	España	69	1.4	PCR, ELISA, WB	CMSP	Arredondo (2011)
	Alemania	85	0	PCR	Tejido prostático	Akgül (2012)
	EEUU	162	1.9	PCR, WB	Tejido prostático	Switzer (2011)
SFC	EEUU	101	67	PCR, WB, cultivo viral	CMSP, plasma	Lombardi (2009)
	EEUU	51	0	PCR, ELISA, WB	CMSP	Switzer (2010)
	EEUU	32	0	PCR	CMSP	Henrich (2010)
	Holanda	32	0	PCR	CMSP	Van Kuppeveld (2010)
	Inglaterra	186	0	PCR	Sangre total	Erlwein (2010b)
	Inglaterra	142	0	PCR, ensayo neutralización	CMSP, Suero	Groom (2010a)
	China	65	0	PCR, RT-PCR	CMSP	Hong (2010)
	España	437	0 PCR;0.9WB	PCR, ELISA, WB	CMSP, plasma	Arredondo (2011)
Donantes	China	391	0	PCR	CMSP	Mi (2010)
	EEUU	1000	0%-0.6%	ELISA, WB	CMSP, plasma	Qiu (2012)

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

La reciente comunicación de la identificación de un nuevo retrovirus humano, el XMRV (virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina) y su asociación con dos patologías bien diferenciadas, el síndrome de fatiga crónica y el cáncer de próstata, ha suscitado un gran interés. A la vista de los trabajos realizados hasta el momento, hay muchas cuestiones no resueltas en relación a la relevancia del XMRV en patología humana.

Entre las más preguntas relevantes figuran las siguientes:

- ¿Cuál es su prevalencia de infección por XMRV en la población general, en distintos grupos de pacientes, en distintas regiones geográficas?
- ¿Cuál es el mejor método diagnóstico?
- ¿Qué proporción de pacientes infectados desarrollan manifestaciones clínicas y cuál es el espectro completo de patología que ocasiona?
- ¿Existen factores genéticos del huésped que favorecen la infección por XMRV?

En este trabajo planteamos los siguientes objetivos que pretenden responder a las preguntas arriba planteadas, examinando diferentes grupos de población que podrían ser más susceptibles de infección por XMRV.

1. Analizar la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de la envuelta p15E y gp70 del XMRV en muestras de suero o plasma de diferentes grupos de pacientes y controles.

2. Desarrollar un método diagnóstico para la confirmación genética de infección por XMRV, utilizando PCR anidada que maximice sensibilidad y especificidad.

3. Estudiar la prevalencia de infección por XMRV en individuos con distintas infecciones por retrovirus humanos y hepatitis víricas, así como enfermedades que pudieran estar asociadas a infecciones por retrovirus, incluyendo enfermedades autoinmunes, SFC y CP.

4. Analizar la prevalencia de mutaciones en la posición 462 del gen de la RNasa L en los diferentes grupos de población con infecciones víricas y otros procesos potencialmente asociados.

3. Pacientes y Métodos

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio aquí planteado es un estudio de corte transversal por el diagnóstico de la infección por XMRV. Tal y como anteriormente se ha comentado en la introducción y para la consecución de los objetivos de esta tesis se seleccionaron grupos de pacientes susceptibles de presentar infección por XMRV. Entre ellos los dos grupos en los que se ha identificado el virus, pacientes con SFC y CP. En esta misma línea se planteó estudiar otros grupos de pacientes con etiología similar como Fibromialgia u otras enfermedades autoinmunes. Además, se estudiaron grupos de pacientes con infecciones virales en los que las vías de adquisición eran sexual y parenteral mayoritariamente y en los que de forma análoga podría identificarse infección por XMRV. Entre ellas se seleccionaron pacientes con infección por VIH, HTLV1/2, VHC y VHB. Como grupo control se eligieron donantes de sangre (**Figura 5**).

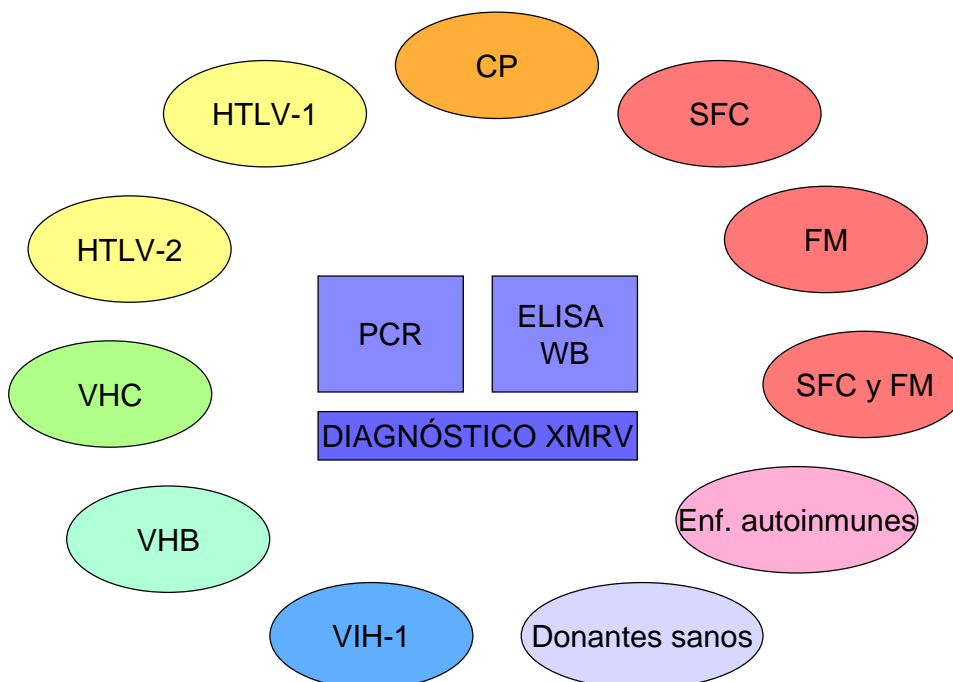


Figura 5. Diagrama del diseño del estudio que incluye los diferentes grupos estudiados.

3.2. PACIENTES

Los pacientes incluidos en esta tesis fueron seleccionados de manera retrospectiva. Se reclutaron muestras de pacientes procedentes de diferentes centros de investigación, biobancos y hospitales que cumplían alguno de los criterios de los grupos diana del estudio.

Pacientes con SFC y/o fibromialgia (FM)

Se incluyeron pacientes con SFC según los criterios de Fukuda y cols. (CDC, 1994):

- Pacientes con SFC diagnosticados según criterios clínicos y fatiga inexplicada, persistente y/o recurrente.
- Cuatro o más de los siguientes síntomas que persisten o recidivan durante seis o más meses: Déficit de la memoria reciente o la concentración, dolor de garganta, ganglios cervicales o axilares dolorosos, dolor muscular, dolor multiarticular sin rubor ni tumefacción, cefalea de patrón o gravedad nuevos, sueño no reparador, malestar tras el ejercicio que dura más de 24 horas.

Las muestras de estos pacientes fueron remitidos desde el Banco Nacional de ADN localizado en Salamanca. Este biobanco preserva muestras de ADN de pacientes con SFC y FM, en otros.

Se recogieron las variables de edad, sexo, país de origen, síntomas más comunes, antecedentes familiares de SFC, antecedentes familiares de dolor crónico inespecífico, forma de inicio (súbita, gradual e insidiosa) y desencadenante aparente.

Pacientes con cáncer de próstata

Se seleccionaron pacientes con un diagnóstico de CP. De todos ellos se remitió muestra de sangre total desde el Servicio de Urología del Hospital Universitario La Paz al Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III. De forma concomitante se recogieron las variables de edad, sexo, país de origen, antígeno prostático específico, estadio clínico del tumor, grupo de riesgo y enfermedades concomitantes.

Pacientes con infección por VIH-1

Se seleccionaron pacientes con infección por VIH confirmado por ELISA y Western Blot (WB) y con seguimiento regular en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III. De los pacientes incluidos se recogieron las variables de edad, sexo, grupo de riesgo de infección, país de origen, tiempo de infección y tratamiento antirretroviral. La carga viral del VIH se determinó cuantificando el ARN viral en plasma, utilizando la técnica comercial kPCR (Versant[®] HIV-1 RNA v1.0 Assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Barcelona, España) con un límite de detección de 37 copias de ARN-VIH/ml.

El recuento de linfocitos T CD4+ se realizó mediante marcaje directo en sangre total (Beckman-Coulter, Miami, FL). Se analizó empleando un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El resultado se expresó en forma de cifra absoluta de células por microlitro (μ l) de sangre y como porcentaje respecto al total de linfocitos circulantes.

Pacientes con infección por HTLV

Se incluyeron pacientes con infección por HTLV-1 y HTLV-2 con seguimiento en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III. Se recogieron las variables de edad, sexo, grupo de riesgo de infección, país de origen, tiempo de infección y tratamiento antirretroviral. El cribado de anticuerpos anti-HTLV se realizó mediante un enzimoimmunoensayo (EIA) (HTLV-I+II; Abbott, Murex) o mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CMIA) desarrollado para Architect, (rHTLV-I/II, Abbott) (Qiu et al., 2008). Ambas técnicas incorporan proteínas recombinantes o péptidos sintéticos del HTLV-1 y del HTLV-2. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes.

Pacientes con hepatitis crónica B

Se incluyeron pacientes con infección crónica por VHB, antígeno de superficie positivo, y en seguimiento en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III. Se recogieron las variables de edad, sexo, grupo de riesgo de infección, país de origen, tiempo de infección y tratamiento.

Pacientes con hepatitis crónica C

Se incluyeron pacientes con infección crónica por VHC con seguimiento en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III. Se recogieron las variables de edad, sexo, grupo de riesgo de infección, país de origen, tiempo de infección y tratamiento.

Pacientes con enfermedades autoinmunes

Fueron incluidos pacientes con enfermedades autoinmunes con seguimiento en el Servicio de Neurología del Hospital Germans Trias i Pujol. Se recogieron las variables de edad, sexo y país de origen.

Donantes sanos

Se solicitó al Centro Regional de Transfusiones de la Comunidad de Madrid muestras de sangre de donantes. Se recogieron las variables de edad, sexo y país de origen de todas las muestras remitidas.

Este estudio fue aprobado por el CEIC del Hospital Carlos III.

3.3. OBTENCIÓN DEL PLASMA Y DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)

Se realizó a partir de muestras de sangre extraídas de los pacientes estudiados y recogidas en tubos Vacutainer de 10 mL con EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) como anticoagulante, procediendo a la separación del plasma y de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, Mo, EEUU).

El plasma se separó mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 30 minutos. Se realizaron alicuotas de 2 ml en criotubos que se preservaron a -70°C. Para la separación de CMSP, se recogió la fracción intermedia del gradiente donde se encuentra la nube de CMSP, se cuantificó y se preservaron las células en condiciones de viabilidad con el fin de realizar estudios de ADN y posibles estudios de cultivo celular y viral.

3.4. ENSAYO SEROLÓGICO PARA XMRV

ELISA

Las muestras de plasma fueron evaluadas para la presencia de anticuerpos para la proteína transmembrana p15E y la proteína de la envuelta gp70 de XMRV. Se llevó a cabo mediante el ensayo prototipo ARCHITECT para XMRV (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) realizados en Abbott Diagnostics ([Qiu et al., 2010](#)).

Se utilizó un formato de ensayo directo con p15E de XMRV *Escherichia coli*-expresado o gp70 de XMRV de mamíferos-expresado. Estos análisis se llevaron a cabo en Chicago a través de la colaboración con Abbott Laboratories.

Los controles positivos del ensayo fueron derivados de *macaco rhesus* infectados por XMRV mediante plasma a 1:1000 o 1:4000. Además se utilizó un pool de plasma humano como control negativo (Qiu et al., 2010) (Onlamoon et al, 2011) (Figura 6).

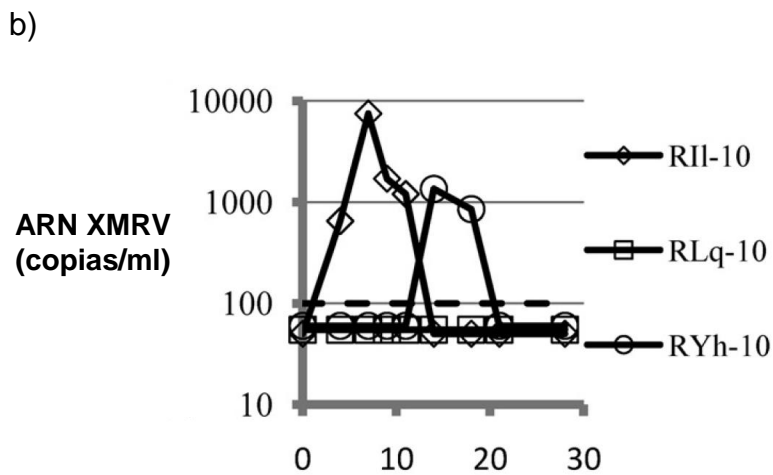
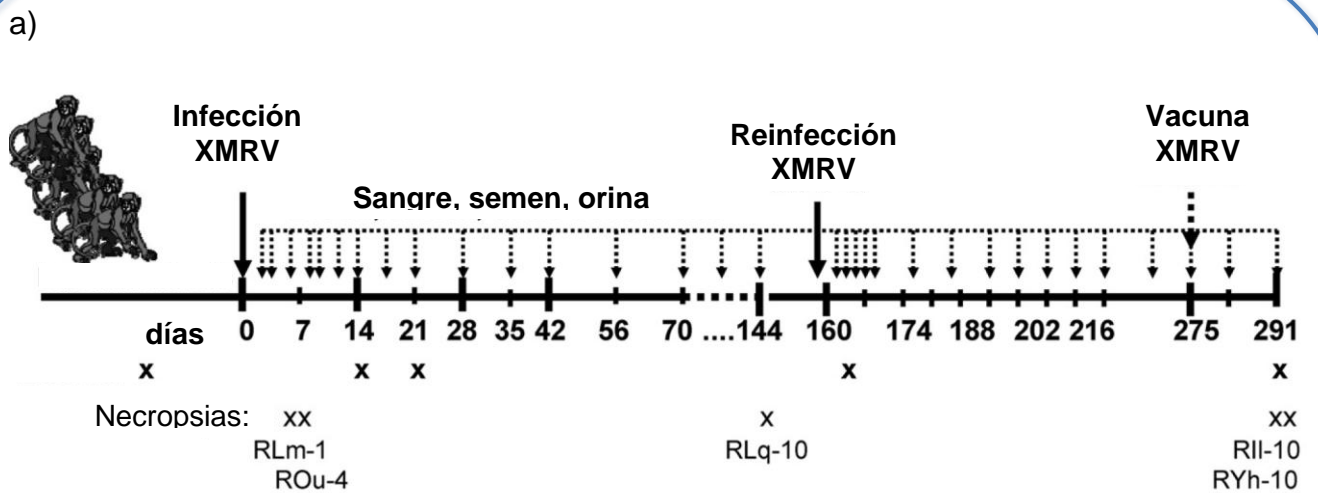


Fig 6. Modelo animal de XMRV (Adaptado Onlamoon et al., 2011). a) Esquema del protocolo de la infección experimental por XMRV de macaco *rhesus* y de las muestras recogidas. b) Medidas de carga viral de XMRV por RT-PCR a tiempo real durante la infección aguda de tres macacos *rhesus* (RII-10, RLq-10 y RYh-10).

Los valores de punto de corte (CO) del ensayo XMRV ARCHITECT se calcularon en base a las fórmulas siguientes: $CO = 0,45 \times [\text{media de unidades relativas de luz (URL) para 1:4000}]$ para el ensayo de p15E y $CO = 0,078 \times (\text{media de URL para 1:1000})$ para el ensayo de gp70. Los resultados del ensayo fueron reportados como la relación de la URL de la muestra con el URL CO (S / CO) para cada muestra. Las muestras con valores de S / CO inferiores a 1,00 fueron considerados reactivos, especímenes con S / CO valores de 1,00 o más se consideraron inicialmente reactivas. Las muestras de plasma (1 ml) fueron examinados para p15E y gp70.

WESTERN BLOT (WB)

Todas las muestras con anticuerpos reactivos a p15E y gp70 con un índice superior a 1,00 en ELISA fueron analizadas utilizando un ensayo de Western Blot (WB) en fase de investigación basado en un lisado de proteínas virales y un recombinante de la proteína gp70 de XMRV. (Qiu et al., 2010).

El análisis del WB utilizando lisados virales purificados de XMRV o proteínas recombinantes de gp70 se desarrolló en modelo de *macaco rhesus* (Qiu et al., 2010). El lisado viral (65 mg / gel) o la proteína recombinante de gp70 (25 mg / gel) se separó por electroforesis en un gel NuPAGE Bis -Tris de dos dimensiones de 4% - 12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de dodecilsulfato sódico. Las bandas de proteína en el gel se transfirieron mediante electroforesis a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Invitrogen). Tras el bloqueo, la membrana fue cortada en tiras de 2 mm. Las tiras se incubaron durante la noche de 2 a 8 °C con muestras humanas diluidas 1:100 o plasmas de macacos infectados por XMRV diluidos 1:200.

Después de la eliminación de los anticuerpos no unidos, las tiras se incubaron con conjugado de fosfatasa alcalina y inmunoglobulina G anti-humana de cabra (Southern Biotech, Birmingham, AL) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las tiras fueron lavadas y se añadió solución de sustrato cromogénico para visualizar las bandas reactivas.

3.5. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de una alícuota de CMSP utilizando el DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN obtenido (200 µL) se conservó a -20°C. La cuantificación de ADN extraído de las muestras de CMSP se realizó mediante el ensayo de espectrofotometría Nanodrop™.

3.6. MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN POR PCR ANIDADA DE XMRV

Se realizaron ensayos de amplificación de fragmentos de gag, pol y env. La detección de secuencias y/o fragmentos genéticos de XMRV se realizó en primer lugar a partir de un ensayo de PCR anidada a partir de la extracción genérica de ADN de CMSP. El método de amplificación se basó en los métodos utilizados por Urisman y cols. y Lombardi y cols. (Science 2009). Para ello, se tuvieron en cuenta las secuencias de los aislados VP35, VP42 y VP62 que presentan zonas conservadas con una homología del 100% pero que comparten únicamente un 80% de homología con otras secuencias de otros retrovirus murinos que podrían confundir y contaminar las muestras, dando lugar a resultados inespecíficos o falsos positivos.

Para la amplificación de la región de gag se utilizaron los cebadores 419F/1154R para la primera ronda cuyo producto resultante fue de 730 pares de bases, y GAG-I-F/GAG-I-R para la segunda ronda cuyo producto presentaba 413 pares de bases (**Tabla 5**).

La PCR fue llevada a cabo usando 100-250 ng de ácidos nucleicos totales y 25 µl de Taq ADN polimerasa (Promega; Madison, WI). Las muestras con resultado positivo fueron evaluadas mediante PCR anidada de secuencias del gen *env* con la batería de cebadores 4166F/7622R y 5922F/6273R ([Lombardi et al., 2009](#)).

Para comprobar los resultados de presencia o ausencia de fragmento amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez teñido con bromuro de etidio, se visualizó mediante luz ultravioleta.

Tabla 5. Cebadores utilizados en los ensayos de PCR y secuenciación.

Cebadores	Región	Secuencia	Posición	Referencia
419F	<i>gag</i>	5'-ATCAGTTAACCTACCCGAGTCGGAC-3'	Externo	Lombardi et al., 2009 Lo et al., 2010
1154R	<i>gag</i>	5'-GCCGCCTCTTCTTCATTGTTCTC-3'	Externo	Lombardi et al., 2009 Lo et al., 2010
GAG-I-F	<i>gag</i>	5'-TCTCGAGATCATGGGACAGA-3'	Interno	Lo et al., 2010
GAG-I-R	<i>gag</i>	5'-AGAGGGTAAGGGCAGGGTAA-3'	Interno	Lo et al., 2010
4166F	pol y env	5'- CAAGAAGGACAACGGAGAGCTGGAG-3'	Externo	Lombardi et al., 2009
7622R	pol y env	5'GGCCTGCACTACCGAAAT TCTGTC-3'	Externo	Lombardi et al., 2009
5922F	env	5'-GCTAATGCTACCTCCCTCCTGG-3'	Interno	Lombardi et al., 2009
6273R	env	5'-GGAGCCCACTGAGGAATCAAAACAGG-3'	Interno	Lombardi et al., 2009

3.7. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Las muestras que presentaban el fragmento de interés fueron purificadas mediante el kit de purificación en columnas Montage (Millipore, Billerica, MA, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.8. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GENOMA DE XMRV (GAG Y ENV)

Tras la purificación se realizó la secuenciación automática utilizando el ensayo comercial dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EEUU) en un secuenciador ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems, EEUU). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los mismos que los utilizados como cebadores internos en la PCR anidada (**Tabla 5**).

Todas las secuencias fueron editadas a través de sus electroferogramas utilizando el programa SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems, Forster City, CA, EEUU). Además, se obtuvo una secuencia consenso de nucleótidos para cada una de las muestras.

3.9. CONTROLES UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE PCR DE XMRV

Como control positivo se utilizó la línea celular de CP 22Rv1 producida por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, EEUU) y enviada a nuestro laboratorio de Biología Molecular.

22Rv1 es una línea de células epiteliales de carcinoma prostático humano derivadas de un xenoinjerto que se propagan en serie en ratones. El crecimiento es estimulado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero no es inhibida por el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF beta-1) (Sramkoski et al., 1999). Posteriormente, se demostró que las células de carcinoma de próstata 22Rv1 producen altos títulos de XMRV (Knouf et al., 2009).

Se cultivó la línea celular 22Rv1 con el objetivo de propagarla para obtener una cantidad de ADN suficiente de XMRV utilizando como control positivo en los sucesivos estudios. Para ello se utilizó un medio de cultivo completo R10 que contenía RPMI con suero bovino fetal (SBF) a una concentración final del 10%, 2% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 0,1% de gentamicina como antibióticos. Después se incubó a una temperatura de 37°C. Tras una semana de cultivo se subcultivó traspasándose las células mediante una solución de tripsina y EDTA y cultivándolas de nuevo con R10 a 37°C.

Los ensayos de amplificación se realizaron en diferentes áreas de laboratorio bien diferenciadas según aparece definido en las Guías de buenas prácticas de laboratorio.

Por otra parte, se utilizaron sistemáticamente controles negativos en cada experimento. Como control negativo se utilizó agua estéril y se obvió el uso de líneas celulares XMRV negativas. En ningún caso, se utilizaron muestras con presencia de XMRV como control positivo para evitar contaminaciones cruzadas.

3.10. ENSAYO DE SENSIBILIDAD DE XMRV

La sensibilidad de la PCR anidada para la detección de secuencias de XMRV fue probada usando diluciones de diez en serie (1 to 10^{-9}) de ADN de CMSP de 22Rv1 en agua teniendo en cuenta el nivel de producción conocida de XMRV de la línea celular 22Rv1 (Knouf et al., 2009). El límite de detección obtenido para este ensayo fue de 3-5 copias por reacción.

3.11. CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Para el proceso de clonación de productos de PCR se utilizó el protocolo *StrataClone™ PCR cloning* (Stratagene, CA, EEUU).

Previamente al proceso de ligación, se midió la cantidad de ADN en el ensayo *Nanodrop* para insertar la cantidad deseada.

El proceso de clonación se realizó en los resultados de productos de PCR positivos en los que no fue posible realizar secuenciación directa.

Para el proceso de ligación se preparó el inserto de ADN usando *Taq* ADN polimerasa. La mezcla de ligación presentó los diferentes componentes:

- 3 μ l *Buffer* de clonación *StrataClone™*
- 2 μ l de producto de PCR (5-50 ng)
- 1 μ l *Vector Mix StrataClone™*

La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos, colocando a continuación la reacción en hielo.

Por cada transformación se descongeló una alícuota de StrataClone SoloPack con bacterias competentes en hielo. A continuación se añadió 1 µl de mezcla de ligación, incubándose 20 minutos en hielo. Tras la incubación de las bacterias a 42°C durante 45 segundos, se pasó inmediatamente a hielo y se incubó 2 minutos. Se añadió 250 µl de agar LB-ampicillin a 42°C. Se incubó las placas 1 hora a 37°C en una estufa con movimiento constante (**Figura 7**). Se seleccionaron las colonias correspondientes que presentaban el inserto de interés identificadas como colonias blancas (sin coloración azul). A continuación se realizó la PCR de selección siguiendo las indicaciones del fabricante.

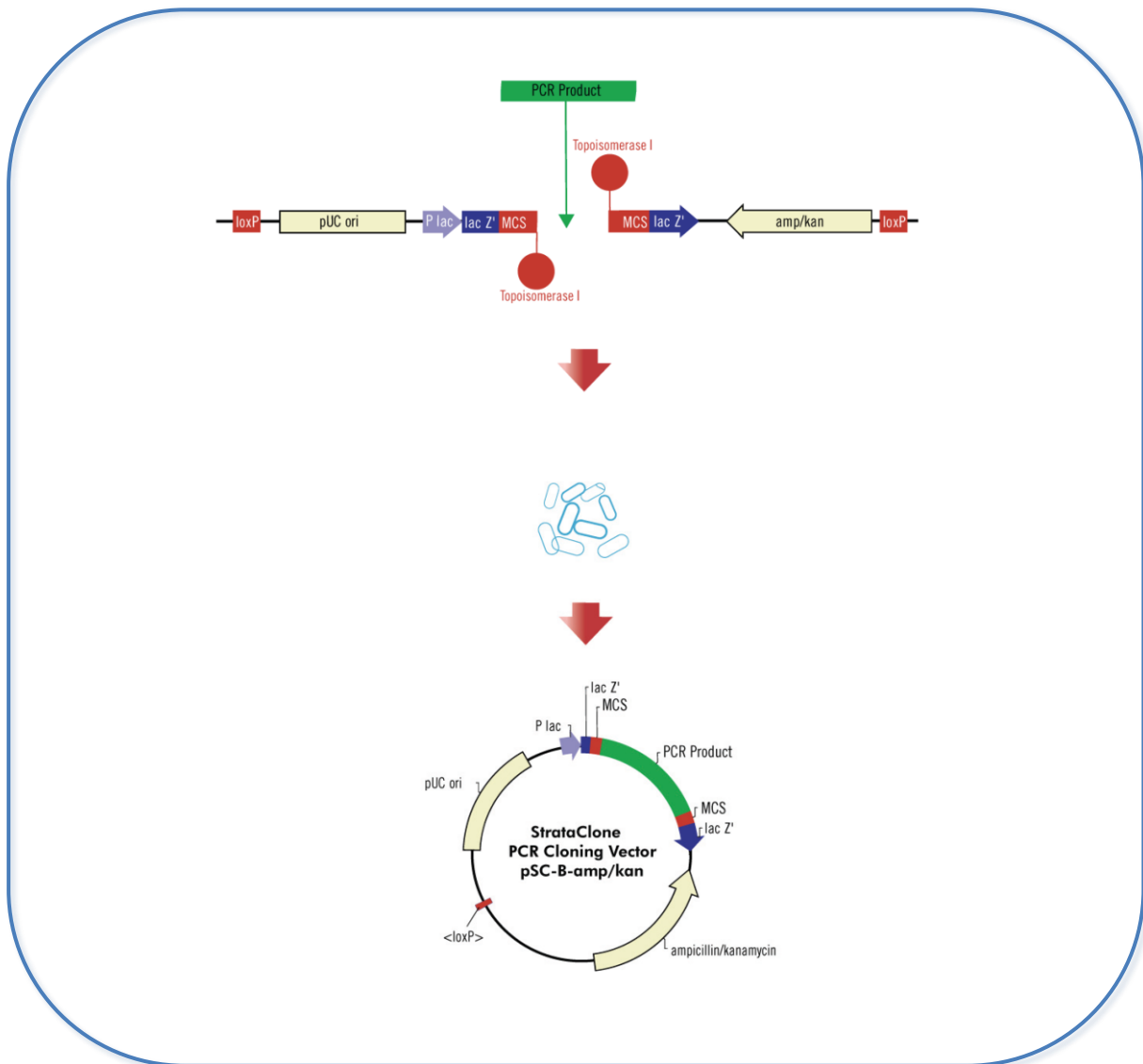


Figura 7. Descripción del método de la clonación de productos PCR StrataClone.

3.12. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS

La tasa de similitud entre las secuencias se analizó mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la plataforma web del NCBI. Las secuencias de XMRV obtenidas se alinearon entre ellas y con otras secuencias disponibles en GenBank utilizando el programa informático MEGA 4 que contiene como herramienta para el alineamiento Clustal W (**Tabla 6**). A continuación, se evaluó el grado de similitud entre las secuencias obtenidas con el fin de establecer diferencias en la procedencia de las mismas y su origen. Para estudiar estas relaciones se realizó el análisis con los métodos matemáticos más adecuados (UPGMA, Neighbor-joining, Maximum likelihood, Maximum parsimony, Bayes) para representar las diferencias entre secuencias en forma de distancias genéticas y construir el árbol filogenético.

Tabla 6. Secuencias de referencia utilizadas en los análisis filogenéticos de los productos de PCR positivos.

Abreviatura	Referencia (Nº de acceso)	Descripción del aislado
XMRV	XMRV VP35 (DQ241301.1)	CP (Urisman, 2006)
	XMRV VP42 (DQ241302.1)	CP (Urisman, 2006)
	XMRV VP62 (DQ399707.1)	CP (Urisman, 2006)
	XMRV 22rv1 (FN692043)	Línea celular 22rv1 (Paprotka, 2010)
	WPI-1106 (GQ497344)	SFC (Lombardi, 2009)
VIH-1	VIH-1 HXB2 (K03455)	(Arya, 1986)
HTLV-1	HTLV-1 (NC_001436.1)	(Petropoulos, 1997)
MoMLV	MLV moloney (AF033811)	(Appanah, 2007)
MLV AKV	MLV AKV (J01998)	(Van Beveren, 1982)

3.13. MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN POR PCR A TIEMPO REAL DE RNASA L

Los pacientes fueron genotipados para la variante R462Q de RNasa L (rs486907) mediante el ensayo PCR a tiempo real (Applied Biosystems) para polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Schlaberg et al., 2009).

El ensayo incluyó Master Mix TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para la amplificación y el análisis genotípico se realizó en el sistema ABI 7000 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Una vez puesto punto el ensayo de PCR a tiempo real para SNP se realizó una amplificación de la región de interés y se procedió a la secuenciación automática utilizando el ensayo comercial dRhodamine Dye Terminador Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EEUU) en el secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, EEUU) para confirmar que el ensayo de PCR discriminaba los alelos mutantes (RQ, QQ) o del alelo salvaje (RR).

3.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos epidemiológicos recogidos y los datos analíticos obtenidos se recogieron en una base de datos y se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15 (Chicago, Illinois). Los datos cualitativos se expresaron en porcentaje mientras que los datos cuantitativos se expresaron como media y desviación estándar o mediana y el correspondiente rango intercuartílico.

El análisis estadístico se llevó a cabo analizando la distribución de las variables de estudio. La comparación de diferencias y resultados entre grupos para cada uno de los parámetros se realizó mediante el uso del test de la T de Student, Mann-Whitney y test de Wilcoxon según correspondía al tipo de variables estudiada y la distribución de la misma.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR XMRV EN DIFERENTES GRUPOS DE POBLACIÓN.

En total se seleccionaron 1.103 individuos que cumplían alguno de los requisitos del estudio. Las principales características de las diferentes cohortes estudiadas se resumen en la **Tabla 7**. La mayoría de los pacientes eran españoles (94%), con una mediana de edad de 44 años y el 47% eran mujeres.

Tabla 7. Características de la población de estudio.

Categoría	No.	Mediana de edad (años)	Género femenino (%)	País de origen (%)
SFC	237	46 (22-78)	86.1	España (100)
FM	100	51 (35-71)	100	España (100)
SFC y FM	100	47 (18-76)	94	España (100)
CP	69	64 (51-81)	0	España (100)
VIH-1	149	46 (21-69)	16	España (82), Sudamérica (14), África (2), Resto de Europa (2)
HTLV-1	24	48 (10-66)	65	Sudamérica (77), España (13), África (10)
HTLV-2	7	42 (33-52)	0	España (86), África (14)
VHB	81	49 (23-63)	8	España (92), Sudamérica (8)
VHC	72	45 (22-59)	45	España (93), Sudamérica (7)
Enfermedad autoinmune	18	46 (26-61)	82	España (100)
Donantes de sangre sanos	246	39 (18-62)	26	España (96), Sudamérica (3), resto de Europa (1)
Total	1103	44 (20-64)	47	España (94)

4.1.1. Características de la población estudiada

SFC y/o FM

En este grupo se incluyeron un total de 437 pacientes de los cuales 237 habían sido diagnosticados con SFC, 100 con FM, y otros 100 pacientes con diagnóstico de SFC y FM.

La mayoría de los individuos con SFC eran mujeres (86.1%) con una mediana de edad de 46 años. Todos los pacientes con FM eran mujeres con una mediana de edad de 51 años. Por último, los individuos que presentaban SFC y FM fueron mayoritariamente mujeres (94%) con una mediana de edad de 47 años (**Figura 8**).

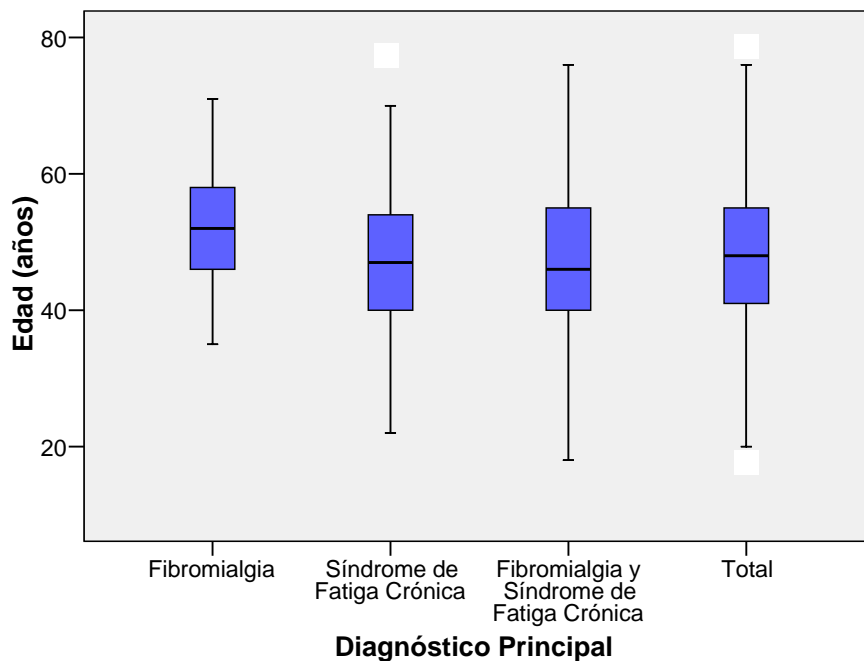


Figura 8. Mediana de edad de los grupos de pacientes con FM, SFC y SFC+FM.

Los síntomas más comunes de los pacientes con SFC fueron cefalea recurrente (82%), sueño no reparador (98%), dolor crónico (79%), debilidad muscular (93%) y agotamiento extremo que dura más de 24 horas después del ejercicio físico (98%). En cuanto a los antecedentes familiares que presentaban la población estudiada, el 27% de los pacientes con SFC estudiados presentaba antecedentes de SFC, mientras que entre los pacientes con SFC y FM fue del 12%. Además, el 15% de los pacientes con FM presentaba antecedentes familiares de FM. En referencia a la forma de inicio de los grupos de pacientes con SFC, FM y SFC+FM, en la mayoría de ellos fue de forma gradual seguido de forma súbita, produciendo un mayor porcentaje de forma súbita en los pacientes con SFC (**Figura 9**).

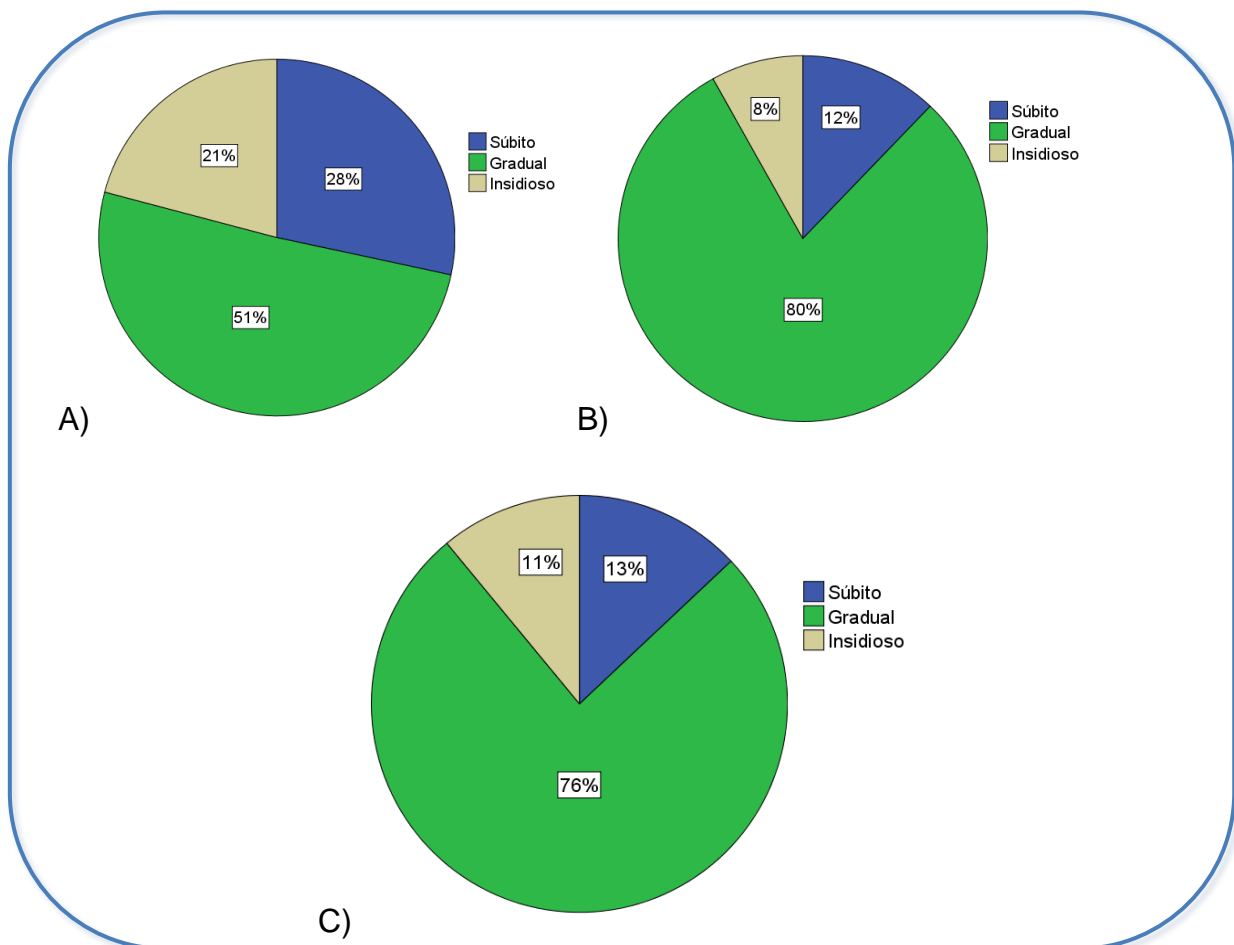


Figura 9. Forma de inicio (súbito, gradual o insidioso) de los grupos de pacientes con SFC (A), FM (B) y SFC+FM (C).

El desencadenante aparente más frecuente en pacientes con SFC fue de acontecimiento vital estresante (34%), seguido de un proceso infeccioso (23%) y de intervención quirúrgica. El desencadenante aparente más frecuente en pacientes con FM fue de acontecimiento vital estresante (45%), seguido de un acontecimiento no aparente (37%). En los casos de pacientes con SFC y FM el desencadenante mayoritario fue de acontecimiento vital estresante (44%), seguido de no aparente (23%) y de intervención quirúrgica (10%) (**Figura 10**).

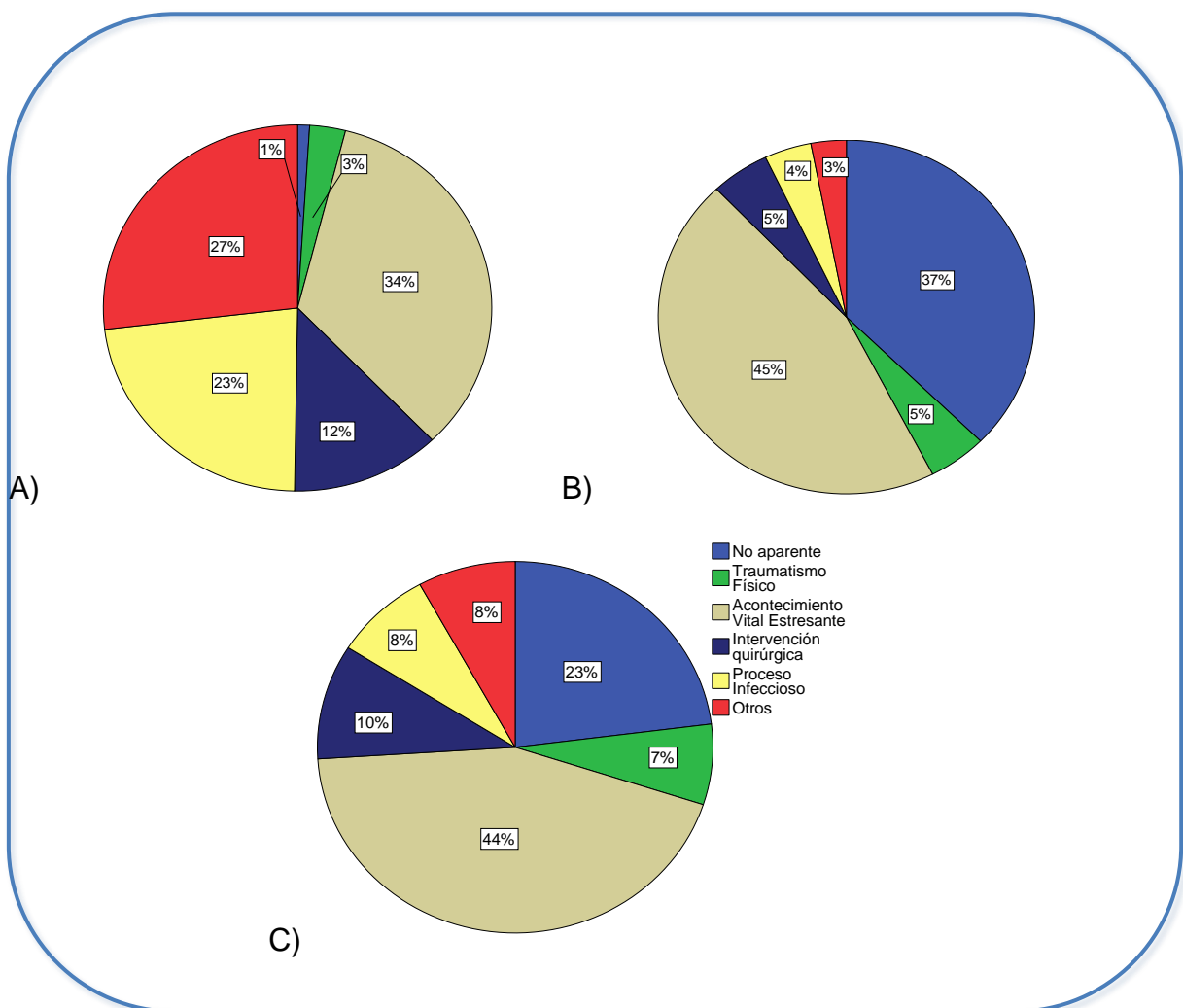


Figura 10. Desencadenante aparente de los grupos de pacientes con SFC (A), FM (B) y SFC+FM (C).

Cáncer de Próstata

Se seleccionaron un total de 69 pacientes con CP en los que la mediana de edad fue de 64 años (51-81). Por otra parte, la media de antígeno prostático específico fue de 8,9 (1,8-65) ng / mL en el momento del diagnóstico, mientras que el estadio clínico del tumor fue T1 en el 84.6%, T2 en el 9.6%, T3 en el 3.8% y T4 en el 1.9%. Por último, la mayoría de los pacientes habían sido intervenidos quirúrgicamente antes de la recogida de la muestra para nuestro análisis.

Enfermedades autoinmunes

Se seleccionaron un total de 18 pacientes con enfermedades autoinmunes. La mitad de los pacientes presentaban Síndrome de Sjögren. El resto presentaban Gastritis atrófica autoinmune, Lupus eritematoso sistémico, Tiroiditis Hashimoto y Colitis ulcerosa. El 82% eran mujeres y presentaban una mediana de edad de 46 años. Todos eran españoles.

Pacientes con infección por retrovirus y/o hepatitis virales.

Se seleccionaron un total de 149 pacientes infectados por VIH-1 que presentaban una mediana de edad de 46 años (21-69). El 87% estaban bajo terapia antirretroviral de gran actividad y 70% presentaban carga viral del VIH indetectable (< 50 copias/ml). En cuanto al grupo de riesgo, el 35% habían adquirido la infección a través del uso de jeringuillas contaminadas (ADVP), el

39% eran homosexuales y el 12% heterosexuales. Por último, el 82% eran de nacionalidad española, el 14% de Sudamérica, el 2% de África y el 1% de otros países europeos.

En cuanto a los pacientes infectados por HTLV-1, el número estudiado fue de 24 en el que el 65% eran mujeres que mayoritariamente (73%) habían adquirido la infección por vía sexual. El 13% eran españoles, el 77% eran de Sudamérica y el 10% eran originarios de África. El 29% presentaba paraparesia espástica tropical (TSP) y el 13% leucemia de células T del adulto (ATLL). En el grupo de pacientes infectados por HTLV-2, fueron un total de 7, todos ellos varones, el 86% de nacionalidad española y el 14% de África y eran adictos a drogas por vía parenteral (86%). De ellos, un paciente presentaba TSP.

Se seleccionaron un total de 81 pacientes infectados por VHB. El 92% eran hombres y presentaban una mediana de edad de 49 años. En cuanto al grupo de riesgo, el 45% pertenecían al grupo ADVP, el 43% eran homosexuales y el 6% heterosexuales. El 92% eran españoles y el resto de Sudamérica.

De los 72 pacientes infectados por VHC estudiados, el 71% eran hombres y presentaban una mediana de edad de 45 años. En cuanto al grupo de riesgo, el 84% pertenecían al grupo ADVP, el 4% eran homosexuales y el 4% heterosexuales. El 93% eran españoles, el 6% eran de Sudamérica y el 1% de otros países europeos.

Donantes sanos

En cuanto a los donantes sanos procedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, se seleccionaron un total de 246 muestras. Todas ellas habían sido previamente cribadas para la presencia de anticuerpos a infecciones virales resultando negativas. El 74% eran hombres y presentaban una mediana de edad de 39 años. El 96% eran españoles, 3% de Sudamérica y el resto de Sudamérica.

4.1.2. Reactividad serológica para anticuerpos frente a XMRV

La **Tabla 8** resume los resultados de cribado de anticuerpos de XMRV. Tres (0.3%) de los 1.103 plasmas analizados fueron reactivos a la proteína transmembrana p15E utilizando el ensayo ARCHITECT. El grado de reactividad de las muestras positivas frente al punto de corte (S/CO) fue superior a 1.0 en 2 individuos infectados con HTLV-1 (1.2 y 4.8, respectivamente) y 1 con VHC (1.04). Un total de 15 (1.4%) de las 1.103 muestras de plasma fueron sero-reativas a la proteína gp70 mediante el ensayo ARCHITECT. Los valores de S/CO fueron superiores a 1.0 en 6 de los 237 individuos con SFC (1.12, 1.13, 1.69, 1.88, 5.63 y 10.53, respectivamente), 1 de los 69 individuos con CP (1.74), 2 de los 149 con infección por VIH (1.00 y 49.05, respectivamente), 1 de los 81 con VHB (5.24), 1/72 con VHC (3.22) y en 4 de los 246 de donantes sanos (1.15, 1.43, 2.16 y 3.35, respectivamente). Los dos pacientes con infección por HTLV-1 que presentaron reactividad frente a p15E en el ensayo ARCHITECT fueron confirmadas mediante WB (**Figura 11**).

Nueve de las muestras reactivas frente a la proteína gp70 con el ensayo ARCHITECT fueron también reactivas para gp70 en el WB. Dos individuos (1 VIH-1 y 1 donante sano) fueron reactivos solo para gp70. Cuatro individuos (1 SFC, 1 CP y 2 donantes sanos) fueron reactivos para *gag* p30 y gp70. Un paciente con SFC fue reactivo para *gag* p15, *gag* p30 y gp70. Un paciente fue reactivo a p15E y gp70 mediante WB y otro paciente con SFC fue reactivo a *gag* p15 y gp70 (**Tabla 9**) (**Figura 12**). En total se obtuvo reactividad frente a alguna de las proteínas de XMRV analizadas en 18 pacientes. Todos menos 2 pacientes eran españoles con una media de edad de 44. De los 18 pacientes con reactividad en el ELISA, 11 fueron confirmados en el WB dando una reactividad final de 11/1.103 (0,997%) En la mayoría de los casos de reactividad fue menor de 5,0, aunque 4 pacientes presentaron reactividad a gp70 superior a 5,0 (10,54 en 1 SFC, 5,63 en 1 SFC, 49,05 en 1 VIH-1 y 15,2 en 1 VHB).

Tabla 8. Reactividad de anticuerpos a gp70 y p15E mediante ELISA ARCHITECT (Abbott). Punto de corte de positividad = 1.

Categoría	No.	No. XMRV p15E Ab+ (%)	No. XMRV gp70 Ab+(%)
SFC	237	0	6 (2.5)
FM	100	0	0
SFC y FM	100	0	0
CP	69	0	1 (1.4)
VIH-1	149	0	2 (1.3)
HTLV-1	24	2 (8.3)	0
HTLV-2	7	0	0
VHB	81	0	1 (1.2)
VHC	72	1 (1.4)*	1 (1.4)*
Enfermedad autoinmune	18	0	0
Donantes de sangre sanos	246	0	4 (1.6)
Total	1103	3 (0.3)	15 (1.4)

* Se trata de dos pacientes diferentes con infección crónica C.

Tabla 9. Características demográficas, serológicas y perfil genético de los individuos positivos para los marcadores de detección de XMRV. Punto de corte de positividad = 1.

No. paciente	Población de riesgo	Edad (años)	Género	Origen	Grupo de riesgo	p15E Ab S/CO	gp70 Ab S/CO	Lisado WB	PCR anidada (gag)	PCR anidada (env)
1	VHC	38	M	España	ADVP	1.04	0.05	neg	neg	neg
2	HTLV-1	48	F	Colombia	Sexual	4.80	0.38	p15E, +/- gp70	neg	neg
3	HTLV-1	10	M	Etiopía	Vertical	1.20	0.04	p15E*	neg	neg
4	SFC	40	F	España	Ninguno	0.18	1.88	neg	neg	neg
5	SFC	48	F	España	Ninguno	0.17	10.58	p15**, p30, gp70	neg	neg
6	SFC	36	F	España	Ninguno	0.15	1.12	p15^, gp70	neg	neg
7	SFC	37	F	España	Ninguno	0.16	5.63	p30, gp70	neg	neg
8	SFC	38	F	España	Ninguno	0.15	1.69	p15E^^, gp70	neg	neg
9	SFC	53	M	España	Ninguno	0.18	1.13	neg	neg	neg
10	CP	81	M	España	Transfusión	0.25	1.74	p30, gp70	pos	neg
11	VIH-1	44	M	España	ADVP	0.20	1.00	gp70	neg	neg
12	VIH-1	48	M	Argentina	Homosexual	0.23	49.05	neg	neg	neg
13	VHC	55	F	España	ADVP	0.14	3.22	neg	neg	neg
14	VHB	47	M	España	Ninguno	0.18	5.24	neg	neg	neg
15	Donante	36	M	España	Ninguno	0.24	3.35	p30, gp70	neg	neg
16	Donante	50	F	España	Ninguno	0.25	2.16	p30, gp70	neg	neg
17	Donante	47	M	España	Ninguno	0.24	1.43	gp70	neg	neg
18	Donante	32	M	España	Ninguno	0.22	1.15	neg	neg	neg

M, masculino; F, femenino; SFC, Síndrome de fatiga crónica; CP, cáncer de próstata; VHC, virus de la hepatitis C crónica; VHB, virus de la hepatitis crónica B;

S/CO, ratio muestra/cut-off; ADVP, adicto a drogas por vía parenteral.

* Estudio de inhibición utilizando proteínas recombinantes mediante la presencia de p15E de la envuelta del virus.

** Estudio de inhibición utilizando proteínas recombinantes mediante la presencia de gag p15 de la matriz del virus.

^ Datos de inhibición sugieren evidencia de gag p15 de la matriz del virus.

^^ Datos de inhibición sugieren evidencia de p15E de la envuelta del virus.

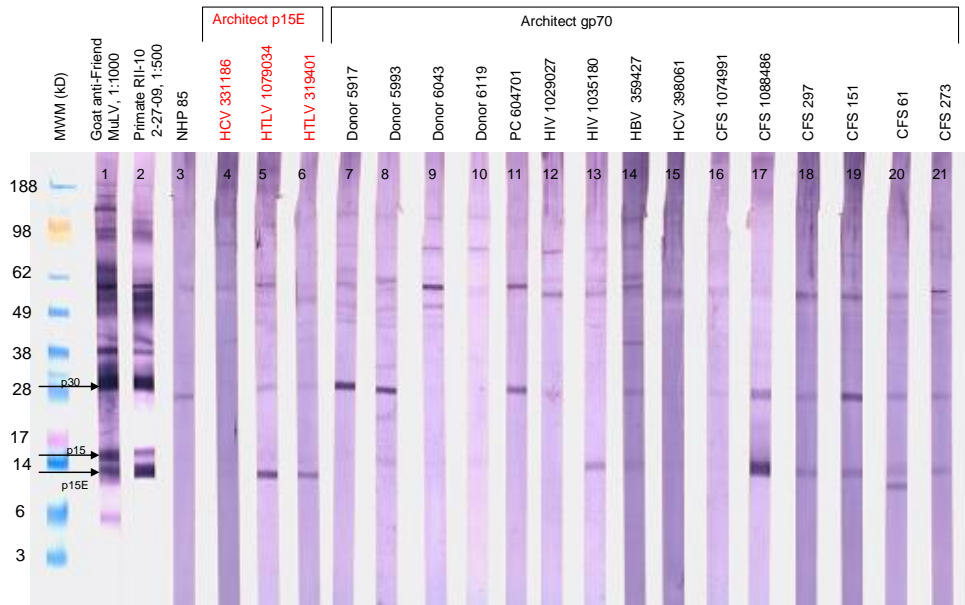


Figura 11. Muestras reactivas para lisados de p30, p15 y p15E mediante WB.

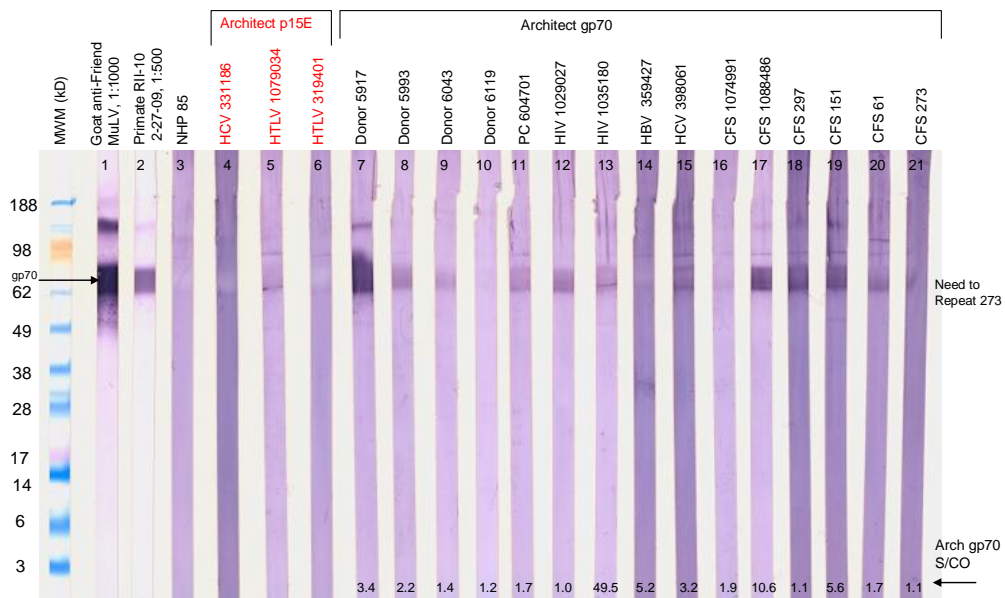


Figura 12. Muestras reactivas para lisados de gp70 mediante WB.

4.1.3. Ensayo de PCR para la detección de XMRV

4.1.3.1. Control positivo

Tras el ensayo de PCR para la detección del control positivo, 22Rv1 produjo una fuerte banda en el gel de agarosa con el tamaño de fragmento apropiado. El fragmento amplificado de células de la línea 22Rv1 fue secuenciado y reveló un 100% de homología con la secuencia consenso previamente identificada (**Figura 13**) (Urisman et al., 2009; Knouf et al., 2009).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF274252.1	Xenotropic MuLV-related virus RKO, complete genome	1109	1109	100%	0.0	96%
FR871850.1	PreXMRV-2 complete proviral genome	1109	1109	100%	0.0	96%
FN692043.2	Xenotropic MuLV-related virus 22Rv1/CWR-R1 complete proviral genome	1109	1109	100%	0.0	96%
JF714652.1	XMRV-like mouse endogenous retrovirus mERV-XL, complete sequence	1109	1109	100%	0.0	96%
DQ241302.1	Xenotropic MuLV-related virus VP42, complete genome	1109	1109	100%	0.0	96%
GQ497344.1	Xenotropic MuLV-related virus clone WPI-1106 putative gag-pro-pol po	1103	1103	100%	0.0	96%
GQ497343.1	Xenotropic MuLV-related virus clone WPI-1178 putative gag-pro-pol po	1103	1103	100%	0.0	96%
EF185282.1	Xenotropic MuLV-related virus VP62, complete genome	1103	1103	100%	0.0	96%
DQ399707.1	Xenotropic MuLV-related virus VP62, complete genome	1103	1103	100%	0.0	96%
DQ241301.1	Xenotropic MuLV-related virus VP35, complete genome	1092	1092	100%	0.0	96%

Figura 13. Análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia obtenida de la muestra positiva.

4.1.3.2. Control negativo

Se utilizaron sistemáticamente controles negativos de agua destilada estéril en cada experimento, tal y como se ha detallado en Pacientes y Métodos de esta tesis. No se observó positividad en estos controles en ninguno de los ensayos realizadas para la detección de XMRV por PCR.

4.1.3.3. Ensayo de sensibilidad de XMRV

La sensibilidad de la PCR anidada para la detección de secuencias de XMRV realizada mediante diluciones de diez en serie (1 to 10^{-9}) de ADN de PMBC de 22Rv1 fue de 3-5 copias por reacción, teniendo en cuenta el nivel de producción conocida de XMRV de la línea celular 22Rv1, y que fue detectado hasta concentraciones de 10^{-6} (**Figura 14**) (Knouf et al., 2009).

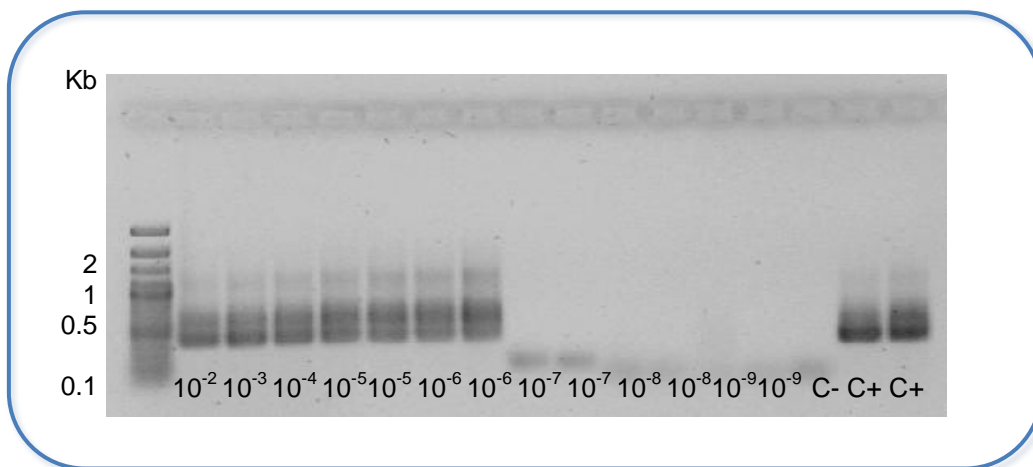


Figura 14. Ensayo de sensibilidad de la PCR anidada para la detección de secuencias de XMRV. Diluciones en serie de ADN de PMBC de 22Rv1 (1 to 10^{-9}), control negativo (C-) y control positivo (C+).

4.1.3.4. Secuencias genéticas de XMRV

Se realizó el cribado de 872 muestras de CMSP del total de los 1103 individuos estudiados llevado a cabo mediante PCR anidada para un fragmento de *gag* de XMRV (**Figura 15** y **16**). Además, todas las muestras con un resultado de PCR positivo para *gag* fueron confirmadas con una segunda PCR que amplifica un fragmento de *env* de XMRV.

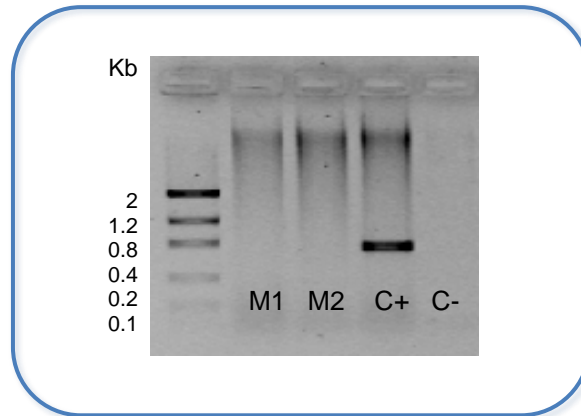


Figura 15. Ensayo de PCR anidada (1ª PCR) para la detección de secuencias de *gag* de XMRV. Muestras (M1 y M2), control positivo (C+) y control negativo (C-).

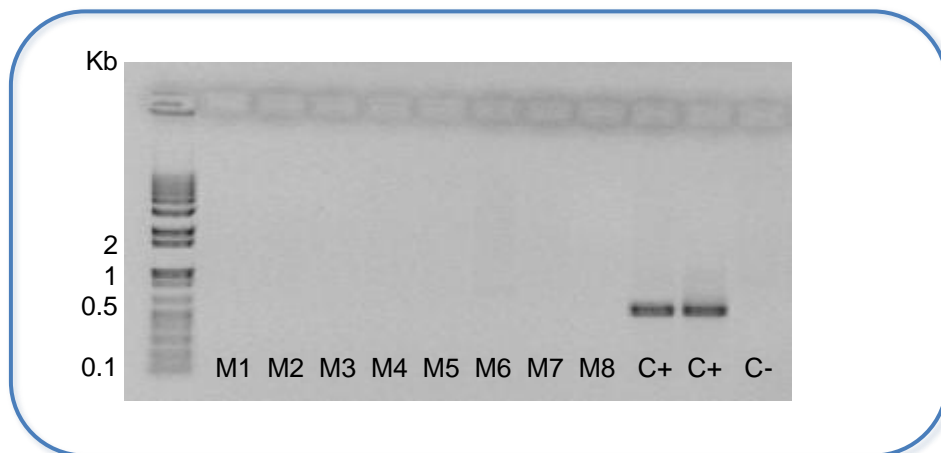


Figura 16. Ensayo de PCR anidada (2ª PCR) para la detección de secuencias de *gag* de XMRV. Muestras (M), control positivo (C+) y control negativo (C-).

El tamaño del fragmento esperado se observó en el producto amplificado de las 4 muestras de 872 reacciones. Estas muestras correspondieron a los pacientes con CP (4/69; 5.8%). El estado clínico de esos tumores fue T1 en 2 pacientes, T2 en 1 y T3 en el sujeto restante.

La secuenciación genética de los productos de PCR mediante clonación del producto amplificado debido a la imposibilidad de la secuenciación directa, reveló que sólo uno presentaba un alto grado de homología [99,7% de VP62 (Número GenBank, NC_007815.1)] a las secuencias de XMRV reportado hasta la fecha (**Figura 17**). Esta muestra positiva para XMRV no se pudo confirmar con secuenciación del producto de PCR posteriores. Otros dos productos amplificados pertenecían a secuencias del genoma humano, y uno era un artefacto de PCR.

Se realizaron amplificaciones por PCR de la región *env* de XMRV y en los 4 casos resultó negativo.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JF274252.1	Xenotropic MuLV-related virus RKO, complete genome	1083	1083	100%	0.0	99%
FR871850.1	PreXMRV-2 complete proviral genome	1083	1083	100%	0.0	99%
FN692043.2	Xenotropic MuLV-related virus 22Rv1/CWR-R1 complete proviral genome	1083	1083	100%	0.0	99%
JF714652.1	XMRV-like mouse endogenous retrovirus mERV-XL, complete sequence	1083	1083	100%	0.0	99%
DQ241302.1	Xenotropic MuLV-related virus VP42, complete genome	1083	1083	100%	0.0	99%
GQ497344.1	Xenotropic MuLV-related virus clone WPI-1106 putative gag-pro-pol	1077	1077	100%	0.0	99%
GQ497343.1	Xenotropic MuLV-related virus clone WPI-1178 putative gag-pro-pol	1077	1077	100%	0.0	99%
EF185282.1	Xenotropic MuLV-related virus VP62, complete genome	1077	1077	100%	0.0	99%
DQ399707.1	Xenotropic MuLV-related virus VP62, complete genome	1077	1077	100%	0.0	99%
DQ241301.1	Xenotropic MuLV-related virus VP35, complete genome	1068	1068	99%	0.0	99%

Figura 17. Análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia obtenida de la muestra positiva.

Secuencias de *gag* XMRV no fueron amplificadas de ninguno de los pacientes con reactividad de anticuerpos a p15E. Sólo un paciente con CP presentó seroreactividad a gp70, además de detectarse secuencias *gag* de XMRV y que fueron confirmadas por análisis filogenético. Este paciente presentaba CP en fase T3 y un antígeno prostático sérico de 36,6 ng / mL en el momento del diagnóstico.

Tras el análisis mediante árbol filogenético de la muestra positiva para *gag* de XMRV con secuencias consenso de XMRV (XMRV 22Rv1 y WPI1106), junto al control positivo y otros retrovirus (VIH-1, HTLV-1, MLV moloney, MLV AKV), se confirmó la estrecha proximidad con las secuencias de XMRV anteriormente descritas (**Figura 18**).

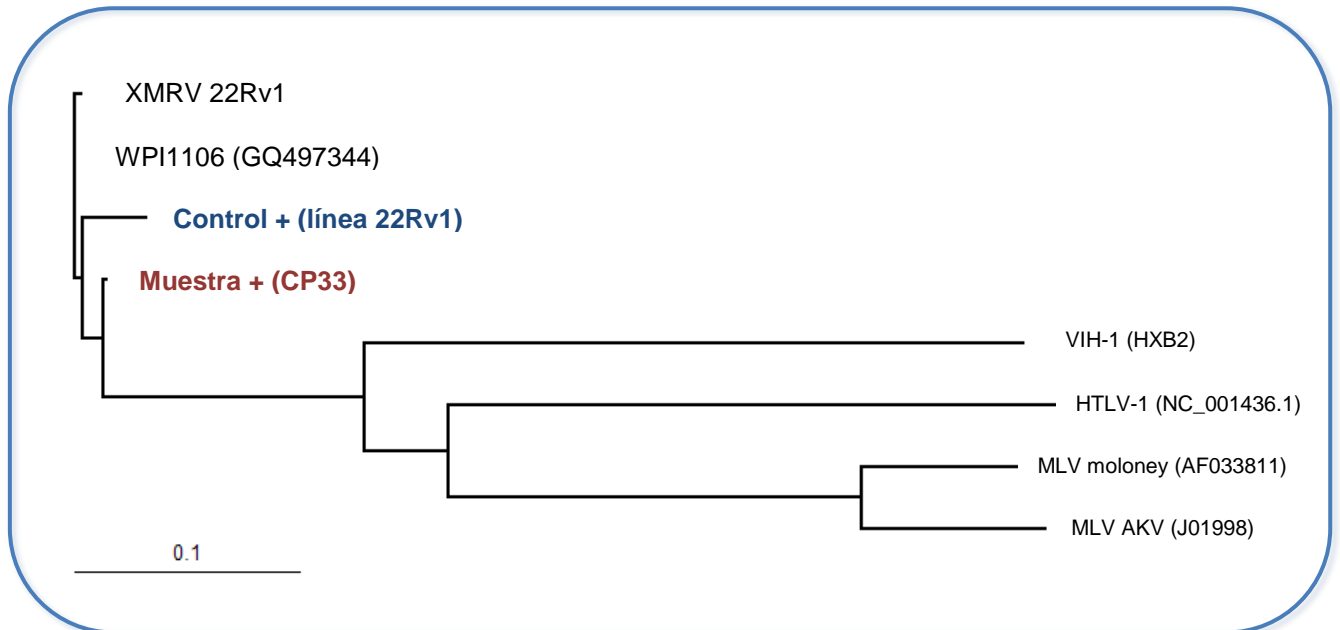


Figura 18. Análisis de secuencias mediante árbol filogenético.

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista AIDS Research and Human Retroviruses y el pdf del artículo aparece como anexo de esta tesis.

“Prevalence of XMRV infection in different risk populations in Spain”. Autores: **Miguel Arredondo**, J Hackett Jr, FR de Bethencourt, A Treviño, D Escudero, A Collado, X Qiu, P Swanson, V Soriano y C de Mendoza. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012. Volume 28, Number 00.

4.2. ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DE R462Q EN RNASA L

Características de los pacientes estudiados

En este estudio se incluyeron 410 individuos, clasificadas de la siguiente manera: 107 con SFC, 67 con CP, 71 con infección VIH-1, 18 con infección por HTLV-1, 15 con hepatitis B crónica, 27 con hepatitis crónica C y 105 donantes de sangre sanos. De todos ellos se disponía de muestra de plasma y CMSP. Las características principales de estos pacientes aparecen recogidas en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características de la población de estudio.

Categoría	No.	Mediana de edad (años)	Género femenino (%)	País de origen (%)
SFC	107	46 (22-72)	84	España (100)
CP	67	64 (51-81)	0	España (100)
VIH-1	71	46 (21-65)	16	España (85), Sudamérica (13), África (2)
HTLV-1	18	48 (10-66)	65	Sudamérica (77), España (13), África (10)
VHB	15	47 (25-59)	12	España (92), Sudamérica (8)
VHC	27	46 (31-58)	40	España (96), Sudamérica (2)
Donantes de sangre sanos	105	40 (21-62)	28	España (96), Sudamérica (3)
Total	410	45 (21-62)	45	España (94)

Los pacientes fueron genotipados para la variante R462Q de RNasa L mediante el ensayo PCR a tiempo real de SNP y se confirmó mediante una amplificación de la región de interés y una secuenciación automática. A continuación se comprobó que los SNP de las diferentes muestras secuenciadas correspondían con los resultados obtenidos del ensayo de PCR a tiempo real de SNP (**Figura 19**).

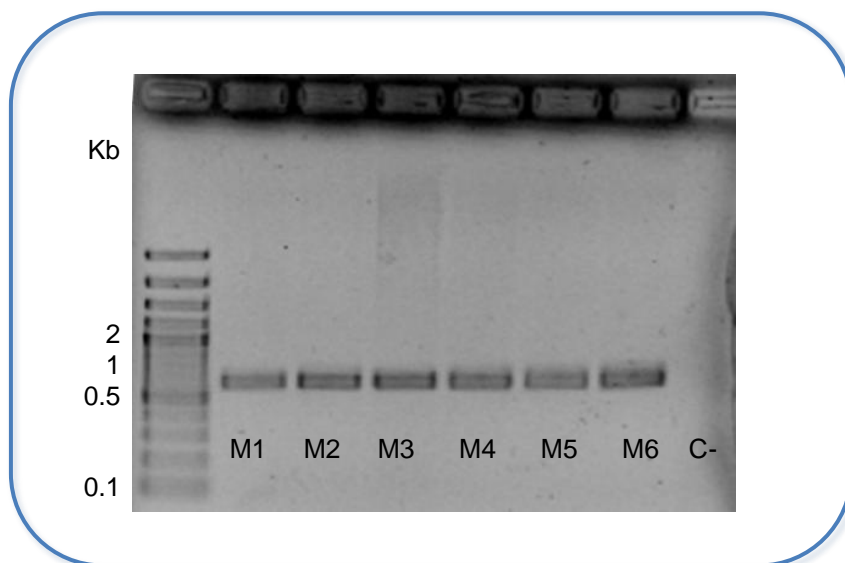


Figura 19. Ensayo de PCR para la amplificación y secuenciación de secuencias de RNasa L que incluye R462Q.

4.2.1. Distribución alélica de R462Q en RNasa L

La frecuencia alélica en la posición R462Q de la población de estudio fue de 139 (33,7%), 204 (49,9%) y 67 (16,3%) para el RR, RQ y QQ, respectivamente (**Figura 20**). Además, no hubo diferencias significativas comparando los donantes de sangre (27%, 54% y 19%, respectivamente), el VIH-1 (37%, 44% y 20%, respectivamente), la hepatitis crónica C (33%, 52% y 15%,

respectivamente), CP (25%, 60% y 15%, respectivamente), y los pacientes con SFC (35%, 51% y 14%, respectivamente).

Sin embargo, los pacientes infectados por HTLV-1 o VHB mostraron una tasa significativamente más baja de las variantes de RQ y QQ que el resto ($p < 0,01$). La tasa de la variante RR en los portadores de HTLV-1 y VHB fue de 67% y 61%, respectivamente (**Tabla 11**).

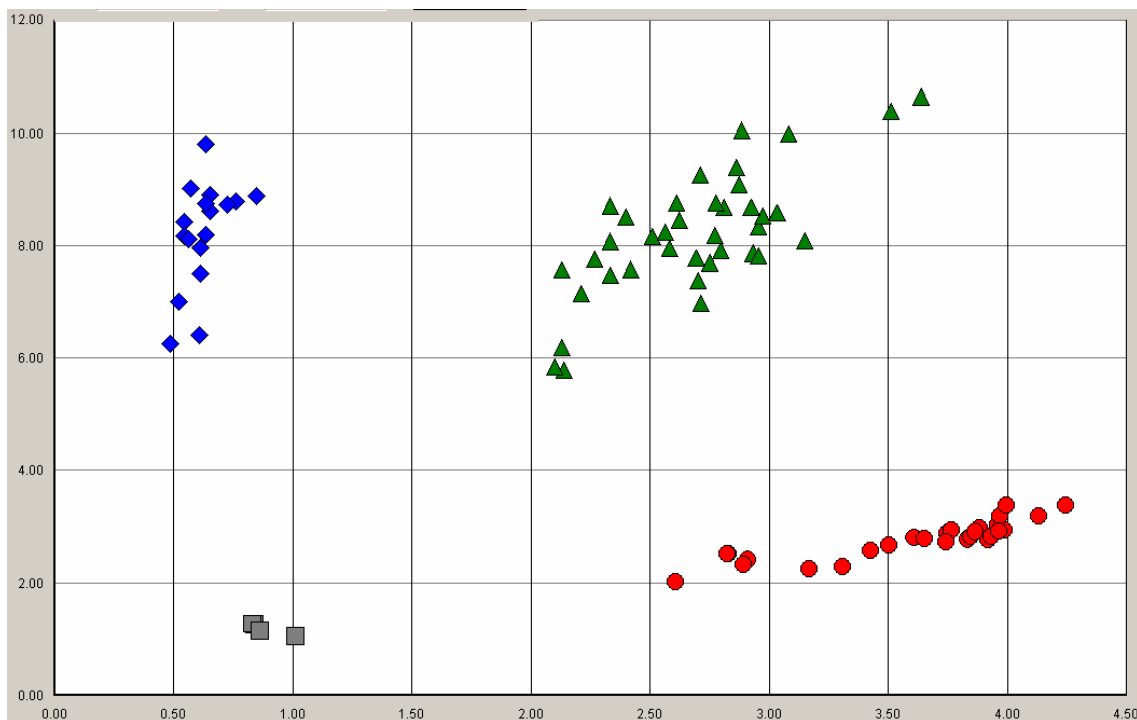


Figura 20. Distribución alélica del ensayo de PCR a tiempo real para polimorfismos de un solo nucleótido de R462Q en el gen RNASEL de la población estudiada (homocigosis RR ●, heterocigosis RQ ▲, homocigosis QQ ◆, controles negativos ■).

Anteriormente se mostró que un total de 14 (3.6%) individuos fueron reactivos para anticuerpos de XMRV, aunque solo uno de ellos fue positivo para secuencias de *gag* de XMRV. Una tendencia hacia una mayor tasa de seroreactividad a XMRV se encontró en los individuos con el genotipo RR en comparación con el resto (6,1% vs 2,3%, respectivamente, $p = 0,083$).

El único paciente positivo para las secuencias de *gag* de XMRV tenía CP y presentaba la variante RR en el gen RNASEL.

Tabla 11. Frecuencia alélica de R462Q en el gen RNASEL de la población estudiada.

Categoría	No.	RR	RQ	QQ
VIH-1	71	36.6	43.7	19.7
HTLV-1	18	61.1	27.8	11.1
VHC	27	33.3	51.9	14.8
VHB	15	66.7	20	13.3
CP	67	25.4	59.7	14.9
SFC	107	34.6	51.4	14
Donantes de sangre sanos	105	26.7	54.3	19
Total	410	33.9	49.8	16.3

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revistas **AIDS Research and Human Retroviruses** y el pdf del artículo aparece como anexo de esta tesis.

“RNASEL alleles and susceptibility to human retroviruses and hepatitis viruses”.

Autores: **Miguel Arredondo**, F de Bethencourt, A Treviño, A Collado, P Torres, L Barbolla, V Soriano y C de Mendoza. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012. Volume 28, Number 00.

5. Discusi3n

5. DISCUSIÓN

En el otoño del año 2009, Lombardi y colaboradores ([Lombardi, et al. 2009](#)) publicaron en la revista *Science* la detección de un retrovirus en un 67% de personas afectadas por Síndrome de fatiga crónica (SFC), mientras que únicamente un 3,7% de los controles sanos analizados mostraban infección por el mismo retrovirus. Este nuevo retrovirus fue denominado XMRV, las siglas de *xenotropic murine related retrovirus*, puesto que las secuencias genéticas analizadas demostraban que estaba genéticamente relacionado, aunque con diferencias significativas, con aislados conocidos de los virus xenotrópicos de la leucemia murina (XMLVs). En las muestras de sangre de los pacientes con SFC se detectaron además de secuencias genéticas de XMRV así como la expresión de antígenos virales en células infectadas y la expansión y aislamiento del virus en cultivo a partir de las muestras de pacientes. Estos hallazgos supusieron una revolución y diferentes grupos de investigación internacionales plantearon estudios en distintos grupos de pacientes en busca de infección por este nuevo retrovirus humano.

En la presente tesis, nos plantemos dos preguntas:

1. ¿Cuál es la prevalencia de infección por XMRV en diferentes grupos de población?
2. ¿Qué papel tienen los cambios en la posición 462 del gen de la RNAsaL en la presencia de anticuerpos frente a diferentes infecciones virales, entre ellas el XMRV?

Con este fin, evaluamos la prevalencia de XMRV en 1.103 muestras de individuos con infecciones por diferentes retrovirus (VIH-1, HTLV-1, HTLV-2), hepatitis virales crónicas (VHB, VHC), SFC y/o FM, enfermedades autoinmunes, CP y donantes de sangre sanos.

5.1. REACTIVIDAD SEROLÓGICA Y AMPLIFICACIÓN GENÉTICA DE XMRV

Las pruebas serológicas, realizadas mediante el ensayo prototipo ARCHITECT para XMRV (Abbott Diagnostics), mostraron una seroprevalencia de anticuerpos muy baja frente a la proteína de transmembrana p15E (0,3%) y la proteína gp70 (1,4%) de XMRV. Cabe destacar que ninguno de los sujetos analizados presentó de forma conjunta anticuerpos frente a p15E y gp70 de XMRV. De las 3 muestras con reactividad frente a p15E, con valores superiores a 1.0, 2 estaban infectados por HTLV-1 y uno presentaba infección crónica por VHC. En cuanto a gp70 se observaron valores de reactividad superiores, tanto en número de muestras, 15 del total analizadas, como en los valores obtenidos en relación al punto de corte (S/CO). Si bien es cierto, únicamente tres pacientes presentaron valores de reactividad elevados (>5), tratándose de un paciente con SFC, un paciente infectado por VIH-1 y otro con infección crónica por VHB.

Es de destacar que la infección por XMRV no se ha detectado en ninguna de las 437 personas con diagnóstico de SFC y/o FM. Este resultado está de acuerdo con los resultados de otros estudios ([Groom et al., 2010a](#); [Erlwein et al., 2010b](#); [Van Kuppeveld et al., 2010](#); [Switzer et al., 2010](#); [Henrich et al.,](#)

2010; Hong et al., 2010; Satterfield et al., 2011; Furuta et al., 2011; Schutzer et al., 2011; Shin et al., 2011), y todos ellos contrastan con los datos de Lombardi y cols. que muestran evidencias de infección por XMRV en el 67% de los pacientes con SFC.

Recientemente, se publicó un trabajo de Knox y colaboradores donde no encontraron evidencias de que XMRV u otros gammaretrovirus murinos estuvieran presentes en muestras de sangre de 43 pacientes con SFC que se habían informado anteriormente como infección por XMRV (Knox et al., 2011).

Un grupo de trabajo formado por gran número de Hospitales y Universidades de EEUU publicó un ambicioso proyecto llevado a cabo en 9 laboratorios sobre el estudio de XMRV en pacientes con SFC y en donantes sanos. Analizan 15 sujetos que habían sido informados como XMRV positivos y 15 donantes sanos previamente informados como negativos, no encontrando evidencias reproducibles de XMRV (Simmons et al., 2011b). En función de los resultados reflejados en este trabajo y en la bibliografía existente, a pesar de la vinculación entre el SFC con infecciones agudas o persistentes por el virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, Herpes virus tipo 6, entre otros, y desde el 2009 con XMRV, no ha podido demostrarse de forma definitiva una asociación causal con ningún agente infeccioso (Khan et al., 1993; DeFreitas et al., 1991; Afari et al., 2003; Devanur et al., 2006; Heneine et al., 1994; Zhang et al., 2010a).

En nuestro estudio no hubo evidencia de un aumento de la seroprevalencia de XMRV en ningún grupo de riesgo específico, con la posible excepción de la cohorte de infectados por HTLV-1. Dos de 24 pacientes infectados por HTLV-1 fueron serorreactivos frente a la proteína p15E, pero no presentaban secuencias de XMRV detectables en CMSP. Es de destacar que la reactividad ocasional en el ensayo de p15E se ha observado en una cohorte más amplia de pacientes infectados por HTLV-1. En este estudio se evaluaron un total de 642 individuos con infección por HTLV-1 en Japón, donde el 4.1% fueron reactivos a la proteína p15E (Qiu et al., 2012).

Esta mayor seroprevalencia podría ser explicada por la reactividad cruzada, debido a la alta homología entre XMRV y HTLV en la región de la transmembrana, además comprobado por el análisis de alineamientos de secuencias que mostraron un alto grado de conservación en la región inmunodominante de la proteína gp21 de la transmembrana de HTLV (Qiu et al., 2011). Sin embargo, ninguna de estas muestras sero-reativas presentaron secuencias de *pol* y *env* (Qiu et al., 2011).

En cuanto a los resultados de prevalencia de los 149 pacientes VIH-1 positivos estudiados, son concordantes con los datos de Kunstman y cols. En este estudio se evaluó la presencia de XMRV en las células de la sangre de 996 pacientes con VIH-1 dentro de un estudio multicéntrico de una cohorte de SIDA por medio de una PCR cuantitativa a tiempo real. XMRV no se detectó en ninguno de las muestras, sugiriendo que la infección podría ser específica de otras poblaciones (Kunstman et al., 2010).

Otro estudio evaluó la presencia de XMRV en CMSP de pacientes VIH-1 positivos y sin tratamiento antirretroviral previo. Se realizó mediante PCR anidada y mediante PCR *TaqMan* en tiempo real, también diseñados ambos para el gen *gag* de XMRV. Tampoco encontraron muestras positivas con lo que estos resultados se suman al creciente escepticismo con respecto a XMRV y su posible asociación con infecciones virales ([Maggi et al., 2012](#)).

Además, 540 pacientes VIH-1 positivos de una cohorte en Londres fueron también XMRV-negativos para un ensayo de PCR *Taqman*, que presentaba una sensibilidad de hasta 5 copias en el ADN del control positivo ([Gray et al., 2011](#)). Un estudio realizado en Uganda en personas infectadas con VIH-1 y donantes de sangre tampoco demostró la asociación entre la infección por XMRV y estos grupos de población ([Tang et al., 2011](#)).

Tampoco fue encontrada presencia de XMRV en la población de estudio de 72 pacientes con VHC. Semejante población en número fue analizada en una cohorte del Reino Unido mostrándose resultados similares de un total de 67 pacientes. Los resultados de los ensayos de detección para XMRV fueron negativos para PCR de *gag* y *env*, así como para ensayos inmunológicos ([Barnes et al., 2010](#)).

Teniendo en cuenta que XMRV es un retrovirus y aparece en CMSP y en plasma, la transmisión sanguínea no se podía descartar. Esta posibilidad se apoya en la demostración de que las células humanas se han infectado en el laboratorio de virus en muestras humanas y en la transmisibilidad por transfusión de otros retrovirus, como por ejemplo el VIH y HTLV ([Lombardi et al., 2009](#)). Por tanto, se sugirió desde la primera asociación de XMRV con SFC, que XMRV tenía el potencial para ser transmitido por transfusiones sanguíneas ([Coffin y Stoye, 2009](#)).

Además, virus relacionados con XMRV son oncogénicos e inmunosupresores en diferentes especies animales, y XMRV ha sido capaz de infectar las células linfoides y difundir a otros tejidos en el modelo de *macaco rhesus* ([Qiu et al., 2010](#)).

Debido a la falta de información para determinar si XMRV o virus relacionados resultan una amenaza para la seguridad en las donaciones de sangre, se crea el Grupo Científico de Trabajo de Investigación (*Scientific Research Working Group*, SRWG) donde participan importantes grupos de investigación de EEUU. Este grupo trata de aclarar la prevalencia de XMRV en población donante, si XMRV es transmisible por la sangre o si existen consecuencias patogénicas en el receptor infectado ([Simmons et al., 2011a](#)). Este grupo contempla 2 posibles hipótesis; la falta de una asociación entre las transfusiones a lo largo de la historia y las 2 patologías humanas que se le atribuyen a XMRV (CFS o CP), sería una evidencia indirecta de que no

parecen estar relacionadas con una transmisión por transfusión de un agente patógeno.

Por el contrario, la presencia de una asociación con SFC y/o CP podría ser una prueba indirecta de la transmisión de un agente patógeno por transfusión y potencialmente podría reforzar la posibilidad de que XMRV o virus relacionados podrían ser transmitidos por transfusiones ([Simmons et al., 2011a](#)). Por otra parte, otros estudios publicados muestran la falta de evidencias para asociar las transfusiones y el desarrollo de CP ([Blomberg et al., 1993](#); [Kikuchi et al., 2007](#); [Hjalgrim et al., 2007](#)).

En un amplio número de donantes de sangre sanos procedentes del Centro regional de transfusiones de la Comunidad de Madrid no se encontraron evidencias de XMRV, por lo que a la vista de nuestros resultados no existiría riesgo de transmisión de infección por XMRV a través de las donaciones.

En otros estudios con donantes sanos, la ausencia de XMRV es general. En un estudio multicéntrico liderado por el CDC no mostraron evidencias de XMRV tras la utilización de ensayos de detección mediante PCR para *gag* y *env*, y ensayos inmunológicos de ELISA y WB. Además se realizaron los ensayos en diferentes centros de investigación de manera ciega ([Switzer et al., 2010](#)). En China tampoco hubo presencia de XMRV estudiado en un amplio grupo de donantes sanos ([Mi et al., 2012](#)). Otro gran número de donantes fueron estudiados en Japón con los mismos resultados ([Furuta et al., 2011](#)).

Por último, el Grupo Científico de Trabajo de Investigación (SRWG) publica en Science que tras analizar pacientes que habían sido informados como XMRV positivos y en donantes sanos concluyen que, en función de los resultados negativos de detección de XMRV, no se justifica el cribado rutinario para XMRV en donantes sanos ([Simmons et al., 2011b](#)).

Cuando se realizó el análisis paralelo de CMSP para conocer la presencia de secuencias de XMRV proviral, se obtuvieron tasas muy bajas de XMRV detectable en esta población de estudio.

Se realizó el cribado en 872 muestras de CMSP del total de 1.103 individuos estudiados llevado a cabo mediante PCR anidada para un fragmento de *gag* de XMRV, y el único individuo con secuencias *gag* de XMRV detectable era un paciente con un CP, una condición en la que XMRV fue descubierto originalmente ([Urisman et al., 2006](#)). Es interesante conocer que este paciente también albergaba los anticuerpos para gp70 y p30 de XMRV. Este individuo presentaba un alto grado de homología a las secuencias de XMRV reportado hasta la fecha, pero también con la secuencia de XMRV presente en la línea celular 22Rv1 utilizada como control positivo en el ensayo de PCR anidada.

El alto grado de homología entre el XMRV descrito en la bibliografía ([Urisman et al., 2006](#); [Lombardi et al., 2009](#)) con el que está presente en la línea celular utilizada como control positivo, añade gran dificultad en saber si ha resultado un problema de contaminación o realmente se ha detectado presencia de XMRV en el pacientes PCR positivo. Los resultados positivos no se

confirmaron en las regiones de env y pol de XMRV dando resultados negativos de PCR en estas regiones.

El paciente con CP que presentaba evidencia serológica y molecular de la infección por XMRV fue diagnosticado de CP a los 81 años de edad y presentaban un estadio del tumor localmente avanzado (T3). Era de raza blanca con antecedentes de cáncer de laringe, pero negó el uso de drogas intravenosas o relaciones homosexuales. El paciente había residido en el Sahara Occidental durante sus años de juventud. Además, este individuo fue transfundido en España hace más de una década. No se pudo identificar a esta persona otros factores de riesgo para la infección por XMRV. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios anteriores que analizaron la asociación de XMRV con CP, los realizaron sobre tejido prostático en lugar de CMSP, a diferencia de como se hizo en el presente estudio. Además, debe considerarse que los niveles de XMRV pueden ser menor en el compartimiento de CMSP en comparación con el tejido prostático.

Finalmente, a pesar de la aparición de un resultado importante en 2009 que apoyaba el vínculo entre el XMRV y el CP debido al descubrimiento del virus en la línea celular 22Rv1 derivada del carcinoma de próstata ([Knouf et al., 2009](#)), estudios posteriores que han analizado amplias series de pacientes con CP en Alemania, Holanda, EEUU o México no han encontrado una asociación con XMRV ([Fischer et al 2008](#); [Verhaegh et al., 2010](#); [Sfanos et al, 2008](#); [Martinez-Fierro et al, 2010](#); [Hohn et al., 2009](#)).

Se han postulado varias razones para explicar la gran discrepancia entre los resultados de los estudios que han examinado la prevalencia de la infección por XMRV en distintas poblaciones humanas. Una explicación, aunque poco probable, podría ser las diferencias en la distribución geográfica de las infecciones por XMRV ([Hohn et al., 2009](#)). A pesar de que el virus podría transmitirse de los ratones salvajes a los seres humanos en un entorno natural, seguido de una rápida difusión en la población humana, la alta similitud de secuencias XMRV en dos continentes sugiere una vía de transmisión alternativa ([van der Kuyl et al., 2011](#)). Otra posible explicación gira en torno a la contaminación que podría dar resultados con falsos positivos. Las posibles fuentes de contaminación que podrían explicar esta disparidad de resultados son varias ([Smith, 2010](#)). Una de ellas es la presencia de ácidos nucleicos relacionados con MLV en algunos reactivos de PCR comerciales que contiene anticuerpos monoclonales de ratón. Estos anticuerpos monoclonales generados en ratones podrían estar contaminados por XMRV o virus relacionados.

Hay que añadir que ciertas Taq polimerasas son preparadas utilizando anticuerpos monoclonales de ratón. Por otra parte, es sabido que frecuentemente son contaminados con ADN de ratón y esto podría generar como falsos positivos amplificaciones de PCR en combinación con cebadores de X-MLV o XMRV ([Erlwein et al., 2010a](#)). Es menos probable que los anticuerpos monoclonales a partir de ratones sean una fuente importante de XMRV en la población humana, ya que su uso es relativamente reciente, pero

podría proporcionar una fuente de futuros derivados de virus de ratón ([van der Kuyl et al., 2011](#)).

Otra fuente de contaminación podría ser las trazas de ADN de ratón encontradas en la sangre humana y en muestras de tejidos debido a la presencia ubicua del ADN del ratón en muestras de laboratorio. Además, en la mayoría de trabajos se utiliza un línea celular de CP que contiene XMRV control positivo y que podría dar lugar a contaminaciones. Por otra parte, los cebadores utilizados en los ensayos de PCR podrían amplificar para ADN de ratón. En resumen, líneas celulares de ratones, cultivos de XMRV o secuencias de ADN de XMRV amplificados en el laboratorio podría contribuir a la contaminación ([Smith, 2010](#); [Robinson et al., 2010](#); [Oakes et al., 2010](#); [Hue et al., 2010](#)). Además, tras el estudio de los sitios de integración de XMRV, también se atribuye a contaminación de PCR ([Garson et al., 2011](#)).

La tasa de mutación de MLV no es diferente de otros retrovirus ([Sanjuán et al, 2010](#)), aunque su tasa de replicación puede ser baja. Esto implica que si la transmisión tuvo lugar hace mucho tiempo, más sustituciones de nucleótidos debían haberse fijado. Sin embargo, el análisis filogenético de secuencias indica que han ocurrido muy pocas mutaciones desde la transmisión ([Urisman et al, 2006](#); [Fischer et al, 2008, 2010](#)).

La detección de provirus de XMRV en CMSP de los *macacos rhesus* infectados experimentalmente fue transitoria ([Sharma et al., 2010](#)). Por otra parte, aunque *macacos rhesus* pueden ser infectados con cantidades muy altas de XMRV

([Onlamoon et al., 2011](#)), hay evidencias importantes de que el virus no infecta, se reproduce y se distribuye en los seres humanos fácilmente ([Hohn y Bannert, 2011](#)). Una de ellas es que XMRV, al igual que otros MLV xenotrópicos, está sujeto a una severa restricción de la replicación en células humanas primarias a través de la actividad de los factores antivirales como APOBEC3 y teterina ([Groom et al., 2010](#); [Paprotka et al., 2010](#); [Stieler y Fischer, 2010b](#)). Pocos tejidos humanos no expresan APOBEC3, y por lo tanto, la hipótesis de que XMRV se replica en uno o más tejidos que no presentan APOBEC3 hace que las infecciones humanas por XMRV probablemente sean raras y potencialmente de origen zoonótico ([Bogerd et al., 2011](#)). Además, estas proteínas de protección frente a infecciones virales inhiben la replicación de manera eficiente en CMSP humanos y muy probablemente en otras células humanas primarias.

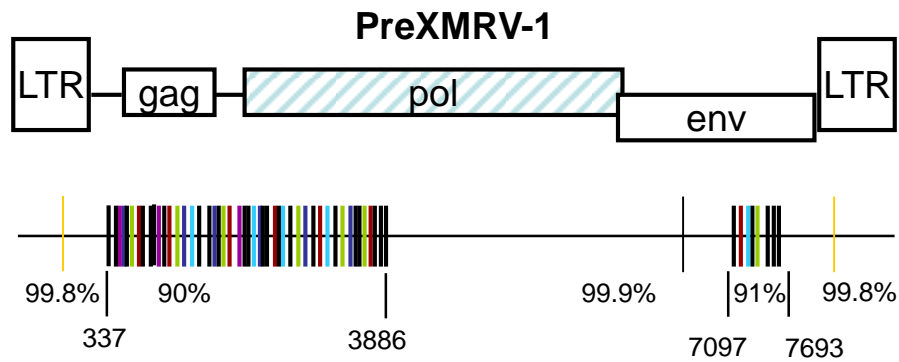
Hay que destacar que en nuestros estudios se utilizaron la línea celular de cáncer prostático como control positivo, la línea 22Rv1, muy utilizada en investigación de XMRV, ya que contiene aproximadamente 10 copias del provirus de XMRV integrado y produce virus infecciosos ([Knouf et al., 2009](#)). El origen de la línea celular 22Rv1 podría representar un caso de transmisión debido a que un carcinoma fue injertado en el modelo de ratón desnudo para establecer esta línea celular permanente ([Sramkoski et al., 1999](#)).

Finalmente, los estudios realizados por Paprotka y colaboradores, en el que estudian de forma minuciosa el posible origen de XMRV han arrojado luz sobre los resultados discrepantes publicados hasta la fecha. Estudiaron las líneas

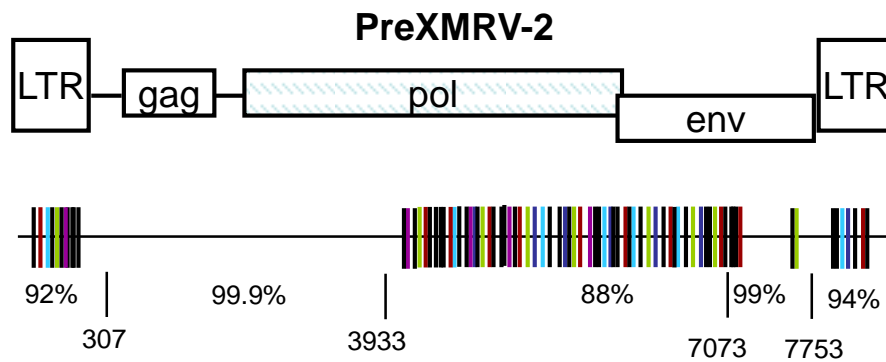
celulares de cáncer de próstata humana CWR22Rv1 y CWR-R1, que producen XMRV prácticamente idénticos a los virus recientemente encontrados en muestras de pacientes, así como su xeno-injerto progenitor de tumor de próstata CWR22 que había sido trasplantado a ratones desnudos. Llegaron a la conclusión de que XMRV se generó como resultado de un único evento de recombinación entre dos provirus endógenos murinos, secuencias que llamaron preXMRV-1 y preXMRV-2. Mientras que preXMRV-1 está estrechamente relacionado con MLV endógeno xenotrópico, pre-XMRV-2 se asemeja al tipo politrópico o politrópico modificado. El hecho de que preXMRV-1 contribuyera a la proteína de la envuelta del XMRV podría explicar por qué el nuevo virus podría replicarse en el xenotrasplante humano, pero no en el huésped murino ([Paprotka et al., 2011](#)) (**Figura 21**).

Según los autores, este evento tuvo lugar alrededor de 1993-1996 en el modelo de ratón desnudo que presentaba el xeno-injerto CWR22 de CP. La ausencia de niveles detectables de XMRV en los primeros xeno-injertos indica que el XMRV no era necesario para el mantenimiento o la propagación de las células tumorales en ratones desnudos. Además, concluyeron que cualquier aislado de XMRV con las mismas o casi las mismas secuencias identificadas en otras partes se originó a partir de este evento, dado que la probabilidad de que el mismo evento de recombinación pueda ocurrir de forma independiente por azar era esencialmente insignificante. En resumen, los nuevos datos presentados hacen hincapié en que la fuente de XMRV podría ser un recombinante generado en el laboratorio hace tres décadas ([Paprotka et al., 2011](#)).

a)



b)



c)

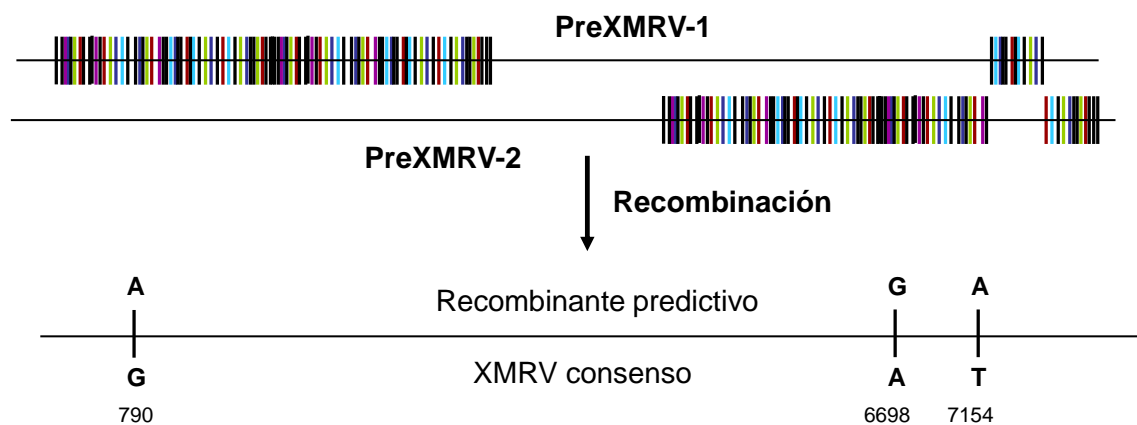


Fig 21. Predicción de recombinante entre PreXMRV-1 y PreXMRV-2 cuyo ensamblaje genera XMRV (Adaptado Paprotka et al., 2011). a) Esquema de PreXMRV-1. b) Esquema de PreXMRV-2. c) Ensamblaje entre PreXMRV-1 y PreXMRV-2.

Este escenario es plausible, ya que el ARN de dos provirus relacionados, en ocasiones se pueden incorporar en un único virión. Esto se debe a que la transcriptasa inversa por lo general intercambia entre las dos hembras de ARN un promedio de cuatro veces por ciclo. Además, se ha demostrado la alta tasa de recombinación genética en MLVs ([Zhuang et al., 2006](#)).

Por otra parte, Yang y colaboradores consideran que los estudios que utilizaron la línea celular 22Rv1 tendrían que revisar sus conclusiones, debido a que podría ser probable que el XMRV presente en esta línea celular sea un artefacto ([Yang et al., 2011](#)).

Otros trabajos muestran como las diferencias técnicas relacionadas con los ensayos utilizados para la detección de XMRV podrían también explicar algunos de los resultados contradictorios ([Mikovits et al., 2010a](#); [Weiss, 2010](#); [Mikovits et al., 2010b](#)).

La falta de métodos altamente sensibles y bien estandarizados para detectar la infección por XMRV unido a la falta de difusión de las muestras positivas en humanos para su utilización como controles positivos, ha contribuido a la controversia. La estrategia de amplificación de PCR llevado a cabo en esta tesis fue combinaciones de cebadores y condiciones de PCR idénticas a las utilizadas previamente para detectar XMRV con éxito ([Urisman et al., 2006](#); [Lombardi et al., 2010](#)).

La cantidad de ADN utilizado en el ensayo de PCR podría representar una limitación. Mayores cantidades de ADN han demostrado que aumenta la eficiencia de detección de XMRV ([Danielson et al., 2010](#)). Por lo tanto, es teóricamente posible que los niveles de ADN en al menos algunas muestras se encuentren por debajo del umbral de detección. Sin embargo, los métodos en el presente estudio son comparables a los utilizados anteriormente para detectar XMRV con éxito ([Urisman et al., 2006](#); [Lombardi et al., 2010](#)).

En resumen, no se encontró asociación entre la infección por XMRV y una variedad de grupos de riesgo en España, incluidos los pacientes con SFC, infecciones retrovirales (VIH y HTLV-1 y HTLV-2), hepatitis viral crónica B y C, enfermedades autoinmunes y CP.

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO PARA EL ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DE R462Q EN RNASA L

La variación genética de R462Q en RNASEL podría influir en las infecciones virales, en el SFC o en el CP. Nuestro estudio trata de aclarar si existe asociación entre las infecciones virales, el SFC y el CP con anomalías en la enzima RNasa L, concretamente con la variante R462Q. La hipótesis de que un virus podría inducir la transformación neoplásica de células de la próstata podría ser acertada. Los virus son conocidos por causar cáncer como el cáncer de cérvix, hígado, sarcoma de Kaposi, entre otros, y el gen de RNASEL ha sido vinculado al cáncer de próstata. Un estudio muestra que el 13% en pacientes con CP presentan QQ. Por otra parte, se ha visto que QQ reduce 3 veces la actividad catalítica de RNasa L comparada con RR ([Casey et al., 2002](#)). Es de destacar que Casey et al. estimaron que los individuos con la mutación R462Q común en homocigosis presentaban más de dos veces mayor riesgo de tener CP. En nuestro estudio se encontró una tasa global inferior de la variante QQ en todos los grupos de estudio. Estos resultados son consistentes con los datos reportados por otros trabajos ([Wiklund et al., 2004](#); [Meyer et al., 2010](#); [Martinez-Fierro et al., 2010](#)), que no mostraron una asociación significativa entre variantes en el codón 462 y el riesgo de presentar CP en poblaciones caucásicas. Asimismo, otros estudios no han demostrado ninguna relación entre el CP, XMRV y el polimorfismo R462Q en el gen RNASEL. No se encontraron diferencias entre la distribución alélica entre casos XMRV PCR-positivas y PCR-negativas, concluyendo que la infección por XMRV es

independiente del polimorfismo R462Q de RNASEL (Fischer et al., 2008; Schlaberg et al., 2009; Hong et al., 2009).

Sin embargo, XMRV fue inicialmente relacionado con el CP en hombres homocigotos QQ para la variante 462. Urisman y colaboradores informaron que el 89% de los casos positivos a XMRV eran homocigotos para la variante QQ, en comparación con el 16% de los casos XMRV negativos (Urisman et al., 2006).

En nuestro estudio, la frecuencia alélica en la posición R462Q de la población de estudio fue de 33,7%, 49,9% y 16,3% para el RR, RQ y QQ, respectivamente. Además, no hubo diferencias significativas comparando los donantes de sangre, pacientes VIH-1+, pacientes con VHC, paciente con CP, y pacientes con SFC, aunque los pacientes infectados con HTLV-1 o VHB mostraron una tasa significativamente más baja de las variantes de RQ y QQ que el resto.

A pesar del tamaño reducido de la población examinada con infección por HTLV-1 o VHB, casi dos tercios de estos pacientes albergaban en homocigosis RR el codón 462. Por el contrario, se encontró en sólo alrededor de un tercio del resto de los individuos examinados en este estudio. Sería importante realizar más estudios con un mayor número de pacientes con estas condiciones para aclarar si las variantes en el gen RNasa L podrían influir en la susceptibilidad a la infección por HTLV-1 y / o por VHB.

En resumen, no se encontró ninguna evidencia de una asociación entre polimorfismos en RNasa L y el riesgo de infección por retrovirus humanos, virus de la hepatitis y / o condiciones potencialmente relacionados con la infección por XMRV, como el SFC o el CP. Por lo tanto, la evidencia de cualquier influencia de variantes R462Q en las enfermedades virales humanas es limitada o inexistentes.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La prevalencia global de anticuerpos frente a las proteínas p15E y gp70 del XMRV en la población estudiada fue del 1,5%, siendo del 0,3% para p15E y del 1,4% para gp70. La seroprevalencia por grupos de población fue inferior al 3% en los pacientes con síndrome de fatiga crónica, cáncer de próstata, infección por VIH-1, hepatitis crónica B, hepatitis crónica C y donantes de sangre, mientras que no se observó reactividad en los pacientes con enfermedades autoinmunes, fibromialgia y pacientes con síndrome de fatiga crónica y fibromialgia.
2. La prueba optimizada de PCR anidada desarrollada en este trabajo para la amplificación de secuencias de *gag* y *env* del XMRV ha demostrado tener una buena especificidad (>97%) y sensibilidad (3-5 copias de DNA del XMRV) en células mononucleares de sangre periférica.
3. De los casos con reactividad serológica frente a las proteínas p15E y gp70 del XMRV, no se pudo confirmar en ninguno la presencia de XMRV por PCR en células mononucleares de sangre periférica.

4. La frecuencia alélica de los polimorfismos en la posición R462 del gen de la RNAsa L fue del 33,7% para RR, 49,9% para RQ y 16,3% para QQ, sin diferencias significativas en los distintos grupos de pacientes con infecciones víricas y los controles sanos. Por tanto, no encontramos evidencia de un papel del gen de la RNAsa L en la susceptibilidad frente a infecciones por retrovirus humanos, hepatitis víricas o procesos potencialmente asociados, como el SFC, el CP y enfermedades autoinmunes.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Afari N, Buchwald D. **Chronic fatigue syndrome: a review.** *Am J Psychiatry.* 2003;160:221-36.

Akgül B, Pfister D, Knüchel R, Heidenreich A, Wieland U, Pfister H. **No evidence for a role of xenotropic murine leukaemia virus-related virus and BK virus in prostate cancer of German patients.** *Med Microbiol Immunol.* 2012;201:245-8.

Appanah R, Dickerson DR, Goyal P, Groudine M, Lorincz MC. **An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation.** *PLoS Genet.* 2007;3:e27.

Arnold R, Makarova N, Osunkoya A, et al. **XMRV infection in patients with prostate cancer: novel serologic assay and correlation with PCR and FISH.** *Urology.* 2010;75:755-61.

Arredondo M, Hackett J, de Bethencourt FR et al. **Limited evidence of XMRV infection in different populations in Spain, including patients with Chronic Fatigue Syndrome and Prostate Cancer.** 18th CROI 2011 (27 febrero - 3 marzo 2011; Boston, MA) [abstract 219].

Arya SK y Gallo RC. **Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:2209-13.

Austin B, James C, Silverman R, Carr D. **Critical role for the oligoadenylate synthetase/RNase L pathway in response to IFN-beta during acute ocular herpes simplex virus type 1 infection.** *J Immunol* 2005;175:1100-6.

Avellaneda A, Pérez A, Izquierdo M, et al. **Chronic fatigue syndrome: aetiology, diagnosis and treatment.** *BMC Psychiatry.* 2009;9 (suppl):1-9.

Barnes E, Flanagan P, Brown A, et al. **Failure to detect xenotropic murine leukemia virus-related virus in blood of individuals at high risk of blood-borne viral infections.** J Infect Dis. 2010;202(10):1482-5.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** Science. 1983;220:868-71.

Battini JL, Rasko JEJ, Miller AD. **A human cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:1385-90.

Bhosle S, Suppiah S, Molinaro R, et al. **Evaluation of cellular determinants required for in vitro xenotropic murine leukemia virus-related virus entry into human prostate cancer and noncancerous cells.** J Virol. 2010;84:6288-96.

Bisbal C, Silverman RH. **Diverse functions of RNase L and implications in pathology.** Biochimie 2007;89:789-98.

Blomberg J, Moller T, Olsson H, Anderson H, Jonsson M. **Cancer morbidity in blood recipients - results of a cohort study.** Eur J Cancer 1993;29A:2101-5.

Bogerd HP, Zhang F, Bieniasz PD, Cullen BR. **Human APOBEC3 proteins can inhibit xenotropic murine leukemia virus-related virus infectivity.** Virology. 2011;410:234-9.

Breyer J, McReynolds K, Yaspan B, Bradley K, Dupont W, Smith J. **Genetic variants and prostate cancer risk: candidate replication and exploration of viral restriction genes.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18:2137-44.

Casey G, Neville P, Plummer S, et al. **RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases.** Nat Genet 2002;32:581-3.

Chaipan C, Dilley KA, Paprotka T, et al. **Severe restriction of xenotropic murine leukemia virus-related virus replication and spread in cultured human peripheral blood mononuclear cells.** J. Virol. 2011;85, 4888-97.

Charrel RN, de Lamballerie X. **Zoonotic aspects of Arenavirus infections.** Vet. Microbiol. 2010;140, 213-220.

Cheng I, Witte J, Jacobsen S, et al. **Prostatitis, sexually transmitted diseases, and prostate cancer: the California Men's Health Study.** PLoS One. 2010; 5:e8736.

Cingoz O, Coffin J. **Identification of a Novel Endogenous Murine Leukemia Virus as an XMRV Ancestor** [abstract 223]. In: Program and abstracts of the 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA.

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, et al. **Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.** Science.1986;233:343-6.

Coffin JM, Stoye JP, Frankel WN. **Genetics of endogenous murine leukemia viruses.** Ann N Y Acad Sci. 1989; 567:39-49.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed.). **Retroviruses.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1997.

Coffin JM, Stoye JP. **A new virus for old diseases?** Science. 2009;326: 530-1.

Cornelissen M, Zorgdrager F, Blom P, et al. **Lack of detection of XMRV in seminal plasma from HIV-1 infected men in The Netherlands.** PLoS ONE. 2010; 5, e12040. doi: 10.1371/journal.pone.0012040

Danielson BP, Ayala GE, Kimata JT. **Detection of xenotropic murine leukemia virus-related virus in normal and tumor tissue of patients from the southern United States with prostate cancer is dependent on specific polymerase chain reaction conditions.** J Infect Dis. 2010;202:1470-7.

Das D, Wojno K, Imperiale MJ. **BKV as a Cofactor in the etiology of prostate cancer in its early stages.** J Virol. 2008;82:2705-14.

D'Arcy F, Foley R, Perry A, et al. **No evidence of XMRV in Irish prostate cancer patients with R462Q mutation.** Eur Urol Suppl. 2008;7,271.

DeFreitas E, Hilliard B, Cheney PR, et al. **Retroviral sequences related to human T-lymphotropic virus type II in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome.** Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:2922-6.

Denner J. **Detection of a gammaretrovirus, XMRV, in the human population: open questions and implications for xenotransplantation.** Retrovirology. 2010;7:16.

Devanur LD, Kerr JR. **Chronic fatigue syndrome.** Journal of Clinical Virology. 2006;37:139-150.

Dillner J, Knekt P, Boman J, et al. **Seroepidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer.** Int J Cancer. 1998;75:564-7.

Dong B, Kim S, Hong S, et al. **An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors.** Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:1655-60.

Erlwein O, Kaye S, Robinson M, and McClure M. **Chronic fatigue syndrome: xenotropic murine leukaemia virus-related virus, murine leukaemia virus, both, or neither?** Proc Natl Acad Sci USA. 2010a. 107, E161.

Erlwein O, Kaye S, McClure M, et al. **Failure to detect the novel retrovirus XMRV in chronic fatigue syndrome.** PloS One. 2010b; 5:e8519.

Fan H. **A new human retrovirus associated with prostate cancer.** Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:1449-1450.

Fischer N, Hellwinkel O, Schulz C, et al. **Prevalence of human gamma-retrovirus XMRV in sporadic prostate cancer.** J Clin Virol. 2008;43:277-83.

Fischer N, Schulz C, Stieler K, et al. **Xenotropic murine leukemia virus-related Gammaretrovirus in respiratory tract.** Emerging Infect Dis. 2010;16:1000-2.

Fukuda K, Straus S, Hickie I, Sharpe M, Dobbins J, Komaroff A. **The chronic fatigue syndrome - a comprehensive approach to its definition and study.** Ann Intern Med. 1994;121:953-9.

Furuta, RA. **The prevalence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in healthy blood donors in Japan.** Cold Spring Harbor Laboratory meeting on retroviruses. 2009.

Furuta RA, Miyazawa T, Sugiyama T, et al. **No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan.** Retrovirology. 2011;8:20.

Gardner MB. **Type C viruses and wild mice: characterization and natural history of amphotropic, ecotropic, and xenotropic MuLV.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1978;79:215-59.

Garson JA, Kellam P, Towers GJ. **Analysis of XMRV integration sites from human prostate cancer tissues suggests PCR contamination rather than genuine human infection.** Retrovirology. 2011;8:13.

Gjoerup O, Chang Y. **Update on human polyomaviruses and cancer.** Advances in Cancer Research. 2010;106:1-51.

Goff S P. **Retroviridae: the retroviruses and their replication. 2000.** 1871-1939. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Gray ER, Garson JA, Breuer J, et al. **No evidence of XMRV or related retroviruses in a London HIV-1-positive patient cohort.** PLoS One. 2011;6(3):e18096.

Groom HCT, Boucherit VC, Makinson K, et al. **Absence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in UK patients with chronic fatigue syndrome.** Retrovirology. 2010a;7:10.

Groom HC, Yap M, Galao R, et al. **Susceptibility of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) to retroviral restriction factors.** Proc Natl Acad Sci USA. 2010b;107,5166-71.

Hart CA, Bennett M. **Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis.** Microbes Infect. 1999;1,1229-37.

Heneine W, Woods TC, Sinha SD, et al. **Lack of evidence for infection with known human and animal retroviruses in patients with chronic fatigue syndrome.** Clin Infect Dis. 1994;18(Suppl 1):S121-5.

Henrich TJ, Li JZ, Felsenstein D, et al. **Xenotropic murine leukemia virus-related virus prevalence in patients with chronic fatigue syndrome or chronic immunomodulatory conditions.** J Infect Dis. 2010;202(10):1478-81.

Hjalgrim H, Edgren G, Rostgaard K, et al. **Cancer incidence in blood transfusion recipients.** J Natl Cancer Inst 2007;99:1864-74.

Hohn O, Krause H, Barbarotto P, et al. **Lack of evidence for xenotropic murine leukaemia virus-related virus (XMRV) in German prostate cancer patients.** Retrovirology. 2009;6:92.

Hohn O, Strohschein K, Brandt AU, et al. **No evidence for XMRV in German CFS and MS patients with fatigue despite the ability of the virus to infect human blood cells in vitro.** PLoS One. 2010;5, e15632.

Hohn O, Bannert N. **Origin of XMRV and its Demise as a Human Pathogen Associated with Chronic Fatigue Syndrome.** *Viruses.* 2011;3:1312-9.

Hong S, Klein E, Das Gupta J, et al. **Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer.** *J Virol* 2009; 83:6995-7003.

Hong P, Li J, Li Y. **Failure to detect xenotropic murine leukaemia virus-related virus in Chinese patients with chronic fatigue syndrome.** *Virol J.* 2010;7:224.

Hovanessian AG, Justesen J. **The human 2'-5'oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation.** *Biochimie.* 2007;89:779-88.

Hue S, Gray E, Gall A, et al. **Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination.** *Retrovirology.* 2010;7:111.

Jason LA, Richman JA, Rademaker AW, et al. **A community-based study of chronic fatigue syndrome.** *Archives of Internal Medicine.* 1999;159:2129-37.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, et al. **A new subtype of human T-cell leukaemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia.** *Science.* 1982;218:571-3.

Kearney M, Maldarelli F. **Current status of xenotropic murine leukemia virus-related retrovirus in chronic fatigue syndrome and prostate cancer: reach for a scorecard, not a prescription pad.** *J Infect Dis.* 2010;202:1463-6.

Khan AS, Heneine WM, Chapman LE, et al. **Assessment of a retrovirus sequence and other possible risk factors for the chronic fatigue syndrome in adults.** *Ann Intern Med.* 1993;118:241-5.

Kikuchi S. **Personal past history and mortality in the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer (JACC)**. Asian Pac J Cancer Prev 2007;8(Suppl):9-20.

Kim S, Kim N, Dong B, et al. **Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer**. J Virol. 2008;82:9964-77.

Klein SL, Calisher CH. **Emergence and persistence of Hantaviruses**. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;315, 217-52.

Klein E, Silverman R. **Inflammation, infection and prostate cancer**. Curr Opin Urol. 2008;18:315-9

Klein HG, Dodd RY, Hollinger FB, et al. **Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) and blood transfusion: report of the AABB interorganizational XMRV task force**. Transfusion. 2011;51:654-61.

Knouf EC, Metzger MJ, Mitchell PS, et al. **Multiple integrated copies and high-level production of the human retrovirus XMRV (xenotropic murine leukaemia virus-related virus) from 22Rv1 prostate carcinoma cells**. J Virol. 2009;83:7353-6.

Knox K, Carrigan D, Simmons G, et al. **No evidence of murine-like gammaretroviruses in CFS patients previously identified as XMRV-infected**. Science. 2011;333:94-7.

Korodi Z, Wang X, Tedeschi R, Knekt P, Dillner J. **No serological evidence of association between prostate cancer and infection with herpes simplex virus type 2 or human herpes virus type 8: a nested case-control study**. J Infect Dis 2005;191:2008-11.

Kunstman KJ, Bhattacharya T, Flaherty J, Phair JP, Wolinsky SM. **Absence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in blood cells of men at risk for and infected with HIV.** AIDS. 2010;24:1784-5.

Kurth R, Bannert N. **Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis.** Norfolk: Caister Academic Press; 2010.

Levy JA. **Xenotropism: the elusive viral receptor finally uncovered.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96: 802-4.

Lo S, Pripuzova N, Li B, et al. **Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors.** Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:15874-9.

Lombardi V, Ruscetti F, Das Gupta J, et al. **Detection of an Infectious Retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with fatigue syndrome.** Science. 2009;326: 585-9.

Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. **Oncogenesis by retrovirus: old and new paradigms.** Rev Med Virol. 2008;18: 387-405.

Maggi F, Focosi D, Lanini L, et al. **Xenotropic murine leukaemia virus-related virus is not found in peripheral blood cells from treatment-naive human immunodeficiency virus-positive patients.** Clin Microbiol Infect. 2012; 18:184-8.

Martinez-Fierro ML, Leach RJ, Gomez-Guerra LS, et al. **Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer.** BMC Cancer. 2010;10:326.

Menéndez-Arias L. **Evidence and controversies on the role of XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome.** Rev Med Virol. 2011 Jan;21(1):3-17. doi: 10.1002/rmv.673. Epub 2010 Nov 26. Review.

Meyer M, Penney K, Stark J, et al. **Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression.** Carcinogenesis 2010; 31:1597-603.

Mi Z, Lu Y, Zhang S, An X, et al. **Absence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in blood donors in China.** Transfusion. 2012;52:326-31.

Mikovits J, Huang Y, Pfof M, et al. **Distribution of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) infection in chronic fatigue syndrome and prostate cancer.** AIDS Rev 2010a;12:149-52.

Mikovits J, Lombardi V, Pfof M, Hagen K, Ruscetti F. **Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome.** Virulence 2010b;1:386-90.

Oakes B, Tai A, Cingoz O, et al. **Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences.** Retrovirology. 2010;7:109.24.

Onlamoon N, Das Gupta J, Sharma P, et al. **Infection, viral dissemination, and antibody responses of rhesus macaques exposed to the human gammaretrovirus XMRV.** J Virol. 2011;85:4547-57.

Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD. **Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus.** Virology. 1998;241:323-30.

Paprotka T, Venkatachari NJ, Chaipan C, et al. **Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs.** J. Virol. 2010;84, 5719-29.

Paprotka T, Delviks-Frankenberry KA, Cingöz O, et al. **Recombinant origin of the retrovirus XMRV.** Science. 2011; 333:97-101.

Petropoulos CJ. Appendix 2: **Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps.** Coffin JM. (Ed.); Retroviruses: 757; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1997.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. **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;77:7415-9.

Qiu X, Hodges S, Lukaszewska T, et al. **Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies.** J Med Virol. 2008;80:484-93.

Qiu X, Swanson P, Luk KC, et al. **Characterization of antibodies elicited by XMRV infection and development of immunoassays useful for epidemiologic studies.** Retrovirology. 2010;7:68.

Qiu X, Swanson P, Tang N, Leckie GW, Devare SG, Schochetman G, Hackett Jr J. **Seroprevalence of xenotropic murine leukemia virus-related virus in normal and retrovirus-infected blood donors.** Transfusion. 2012;52:307-16.

Reeves WC, Jones JF, Maloney E, et al. **Prevalence of chronic fatigue syndrome in metropolitan, urban, and rural Georgia.** Popul Health Metr. 2007;8:5.

Rennert H, Zeigler-Johnson C, Addya K, et al. **Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14:949-57.

Robinson M, Erlwein O, Kaye S, et al. **Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV.** Retrovirology. 2010;7:108.

Rodríguez JJ, Goff SP. **Xenotropic murine leukaemia virus-related virus establishes an efficient spreading infection and exhibits enhanced transcriptional activity in prostate carcinoma cells.** J Virol. 2010;84(5):2556-62.

Rökman A, Ikonen T, Seppälä E, et al. **Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer.** Am J Hum Genet 2002; 70:1299-304.

Rowe WP. **Genetic factors in the natural history of murine leukemia virus infection.** Cancer Res. 1973;33: 3061-8.

Sakuma T, Tonne JM, Malcolm JA, et al. **Long-term infection and vertical transmission of a gammaretrovirus in a foreign host species.** PloS One. 2012;7(1):e29682.

Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. **High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma.** J Urol. 2003;170:998-1002.

Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. **Viral mutation rates.** J Virol. 2010;84:9733-48.

Satterfield BC, Garcia RA, Jia H, Tang S, Zheng H, Switzer WM. **Serologic and PCR testing of persons with chronic fatigue syndrome in the United States shows no association with xenotropic or polytropic murine leukemia virus-related viruses.** Retrovirology. 2011;8:12.

Sarma A, McLaughlin J, Wallner L, et al. **Sexual behaviour, sexually transmitted diseases and prostatitis: the risk of prostate cancer in black men.** J Urol. 2006;176:1108-13.

Scherbik S, Paranjape J, Stockman B, Silverman R, Brinton M. **RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus.** J Virol 2006; 80:2987-99.

Schlaberg R, Choe D, Brown K, et al. **XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors.** Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:16351-6.

Schutzer SE, Rounds MA, Natelson BH, Exker DJ, Eshoo MW. **Analysis of cerebrospinal fluid from chronic fatigue syndrome patients for multiple human ubiquitous viruses and xenotropic murine leukemia-related virus.** Ann Neurol. 2011;69:735-8.

Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, Dick JD, De Marzo AM, Isaacs WB. **A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms.** The Prostate. 2008;68:30-320.

Sharma P, Suppiah S, Molinaro R, et al. **Organ and cell lineage dissemination of XMRV in rhesus macaques during acute and chronic Infection** [abstract 150LB]. In: Program and abstracts of the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA.

Sharma P, Rogers KA, Suppiah S, et al. **Sexual Transmission of XMRV: A Potential Infection Route.** Adv Virol. 2011:965689.

Shin CH, Bateman L, Schlaberg R, et al. **Absence of XMRV retrovirus and other murine leukemia virus-related viruses in patients with chronic fatigue syndrome.** J Virol. 2011; 85:7195-202.

Silverman RH, Nguyen C, Weight CJ, Klein EA. **The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome.** Nature Reviews Urology. 2010;7:392-402.

Simmons G, Glynn SA, Holmberg JA, et al; Blood XMRV Scientific Research Working Group. **The Blood Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus Scientific Research Working Group: mission, progress, and plans.** Transfusion. 2011a;51:643-53.

Simmons G, Glynn SA, Komaroff AL, et al; Blood XMRV Scientific Research Working Group (SRWG). **Failure to confirm XMRV/MLVs in the blood of patients with chronic fatigue syndrome: A Multi-Laboratory Study.** Science. 2011b;11;334:814-7.

Smith R. **Contamination of clinical specimens with MLV-encoding nucleic acids: implications for XMRV and other candidate human retroviruses.** Retrovirology. 2010;7:112.

Sramkoski RM, Pretlow TG, Giaconia JM, et al. **A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1.** In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999;35,403-9.

Stieler K, Schulz C, Lavanya M, Aepfelbacher M, Stocking C, Fischer N. **Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV.** Virology. 2010a;399:23-30.

Stieler K, Fischer N. **Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV.** PLoS One. 2010b;5. e11738.

Stocking C, Kozak CA. **Murine endogenous retroviruses.** Cell Mol Life Sci. 2008;65:3383-98.

Strickler HD, Burk R, Shah K, et al. **A multifaceted study of human papillomavirus and prostate carcinoma.** Cancer. 1998;82:1118-25.

Sutcliffe S, Giovannucci E, De Marzo A, et al. **Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15:2160-6.

Switzer WM, Jia H, Hohn O, et al. **Absence of evidence of xenotropic murine leukemia virus-related virus infection in persons with chronic fatigue syndrome and healthy controls in the United States.** Retrovirology. 2010;7:57.

Taylor CS, Nouri A, Lee CG, Kozak C, Kabat D. **Cloning and characterization of a cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukaemia viruses.** Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:927-932.

Tang S, Zhao J, Viswanath R, et al. **Absence of detectable xenotropic murine leukemia virus-related virus in plasma or peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus Type 1-infected blood donors or individuals in Africa.** Transfusion. 2011;51:463-8.

Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, et al. **A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p.** Nat Genet. 2001;27:172-80.

Tsai W-L, Chung RT. **Viral hepatocarcinogenesis.** Oncogene. 2010;29:2309-24.

Tersago K, Verhagen R, Vapalahti O, Heyman P, Ducoffre G, Leirs H. **Hantavirus outbreak in Western Europe: reservoir host infection dynamics related to human disease patterns.** Epidemiol Infect. 2011;139:381-90.

Urisman A. **Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant.** PloS Pathog. 2006;2:e25

van der Kuyl AC, Cornelissen M, Berkhout B. **Of Mice and Men: On the Origin of XMRV.** Front Microbiol. 2011;1:147.

van Kuppeveld FJM, de Jong AS, Lanke KH, et al. **Prevalence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in patients with chronic fatigue syndrome in the Netherlands: retrospective analysis of samples from an established cohort.** BMJ. 2010;340:c1018.

Van Beveren C, Rands E, Chattopadhyay SK, Lowy DR y Verma IM. **Long terminal repeat of murine retroviral DNAs: sequence analysis, host-proviral junctions, and preintegration site.** J Virol. 1982;41:542-56.

Verhaegh GW, de Jong AS, Smit FP, Jannink SA, Melchers WJG, Schalken JA. **Prevalence of human xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus (XMRV) in Dutch prostate cancer patients.** *The Prostate.* 2010; DOI: 10.1002/pros.21255.

Voevodin A, Marx PA. **Simian Virology.** Ames: Wiley-Blackwell; 2009.

Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ. **Human RNA “rumor” viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72:157-196.

Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., and Coffin, J. **RNA Tumor Viruses.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1982.

Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. **RNA Tumor Viruses.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1984.

Weiss R, Tekh N, Varmus H, Coffin J. **RNA Tumor Viruses.** Ed.2. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1985.

Weiss RA. **A cautionary tale of virus and disease.** *BMC Biol.* 2010;8:124.

Wiklund F, Jonsson B, Brookes A, et al. **Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2004; 10:7150-6.

Yang J, Battacharya P, Singhal R, Kandel ES. **Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in prostate cancer cells likely represents a laboratory artifact.** *Oncotarget.* 2011;2:358-62.

Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. **Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections.** *Prostate.* 2002;53:263-76.

Zhang L, Goudh J, Christmas D, et al. **Microbial infections in eight genomic subtypes of Chronic Fatigue Syndrome / Myalgic Encephalomyelitis (CFS/ME)**. J Clin Pathol. 2010a;63:156-64.

Zhang Y, Zhang H, Dong X, Yuan J, Zhang H, Yang X, Zhou P, Ge X, Li Y, Wang LF, Shi Z. **Hantavirus outbreak associated with laboratory rats in Yunnan, China**. Infect Genet Evol. 2010b;10:638-44.

Zhuang J, Mukherjee S, Ron Y, Dougherty JP. **High rate of genetic recombination in murine leukemia virus: implications for influencing proviral ploidy**. J. Virol. 2006;80:6706-11.

8. Publicaciones surgidas durante esta tesis

ARTÍCULOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- **Miguel Arredondo**, F de Bethencourt, A Treviño, A Collado, P Torres, L Barbolla, V Soriano y C de Mendoza. RNASEL alleles and susceptibility to human retroviruses and hepatitis viruses. AIDS Res Hum Retroviruses. 2012.

- **Miguel Arredondo**, J Hackett Jr, FR de Bethencourt, A Treviño, D Escudero, A Collado, X Qiu, P Swanson, V Soriano y C de Mendoza. Prevalence of XMRV infection in different risk populations in Spain. AIDS Res Hum Retroviruses. 2012;28(9):889-94.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **Miguel Arredondo**, F de Bethencourt, A Treviño, A Collado, Pilar Torres, Luz Barbolla, V Soriano y C de Mendoza. Influence of genetic abnormalities in the RNASEL on the susceptibility to human retrovirus and hepatitis infections. International HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance Workshop 2011.

- **Miguel Arredondo**, J Hackett, FR de Bethencourt, A Treviño, D Escudero, A Collado, X Qiu, P Swanson, V Soriano y C de Mendoza. Limited evidence of XMRV infection in different populations in Spain, including patients with Chronic Fatigue Syndrome and Prostate Cancer. CROI 2011.

- **Miguel Arredondo**, FR de Bethencourt, A Treviño, D Escudero, P Labarga, A Collado, FJ García-Fructuoso, P Parra, A Peris-Pertusa, CA Sánchez, V Soriano y C de Mendoza. Estudio de la presencia de XMRV en diferentes grupos de pacientes en España. Oral presentation GESIDA 2010.

OTRAS PUBLICACIONES

- **Miguel Arredondo**, C Garrido, N Parkin, N Zahonero, S Bertagnolio, V Soriano y C de Mendoza. Comparison of HIV-1 RNA Measurements Using Plasma and Dried Blood Spots (DBS) in the Automated Abbott Real Time Viral Load Assay. J Clin Microbiol. 2011. Dec 14.

- Garrido C, Zahonero N, Corral A, **Miguel Arredondo**, Soriano V, de Mendoza C. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA measurements obtained with dried blood spots and those obtained with plasma by use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV load tests. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1031-6.

- Treviño A, Soriano V, Rodríguez C, **Miguel Arredondo**, Rivas P, Herrero-Mendoza D, Parra P, Del Romero J, Anta L, Puente S, de Mendoza C. Changing Rate of Non-B Subtypes and Coinfection with Hepatitis B/C Viruses in Newly Diagnosed HIV Type 1 Individuals in Spain. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010 Dec 6.

9. Abreviaturas

9. ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ATLL: Leucemia de células T del adulto

ATP: *Adenosine triphosphate*, Trifosfato de adenosina

AZT: Zidovudina

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CA: Cápside

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

CP: Cáncer de Próstata

DMSO: *Dimetil-Sulfoxide*, dimetil sulfóxido

EDTA: *Etilen-Diamine-Tetraacetic Acid*, Ácido etilendiamino tetraacético

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*, Hibridación in situ con fluorescencia

FLV: *Feline Leukaemia Virus*, Virus de la leucemia felina

FM: Fibromialgia

GALV: *Gibbon Ape Leukaemia Virus*, Virus de la leucemia de gibón

HHV8: *Human herpesvirus 8*

HTLV-1: Virus Linfotrópico Humano de células T de tipo 1

HTLV-2: Virus Linfotrópico Humano de células T de tipo 2

IFN: Interferón

IN: Integrasa

KoRV: *Koala retrovirus*, Retrovirus de koala

LTR: *Long Terminal Repeat*, Secuencias terminales largas repetidas

MA: Matriz

MLV: *Murine Leukaemia Virus*, Virus de la leucemia murina

NC: Nucleocápside

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

PERV: *Porcine endogenous retrovirus*, Retrovirus endógeno porcino

POL: Polimerasa

PRO: Proteasa

RT: Transcriptasa inversa

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa.

SFC: Síndrome de Fatiga Crónica

SU: Subunidad de superficie

TM: Subunidad transmembrana

TSP: Paraparesia espástica tropical

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1

VIH-2: Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 2

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

X-MLV: Virus de la Leucemia Murina Xenotrópico

XMRV: *Xenotropic Murine leukemia virus-Related Virus*, Virus relacionado con el virus de la leucemia murina xenotrópico

XPR1: *Human Xenotropic and polytropic retrovirus Receptor 1*