

ARTÍCULO ORIGINAL

Reconstrucción de la evolución molecular de la infección actual por el virus linfotrópico humano tipo I en Colombia

Mónica Chávez ¹, Martha C. Domínguez ¹, Abraham Blank ²,
Milton Quintana ³, Yoshito Eizuru ⁴, Felipe García ¹

¹ Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

² Departamento de Morfología, Laboratorio Sasakawa, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

³ Facultad de Medicina, Corporación Universitaria del Sinú, Montería, Colombia.

⁴ Centro de Enfermedades Crónicas Virales, Facultad de Medicina, Universidad de Kagoshima, Kagoshima, Japón.

La infección por el virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) es un problema de salud pública en varias zonas endémicas de Colombia. La subtipificación del HTLV-I se basa en los análisis de polimorfismos en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLP) de la región 3'LTR del ADN proviral. A partir de 31 aislamientos de HTLV-I recolectados en diferentes regiones del territorio nacional se realizó un análisis de RFLP en un fragmento de ADN de 737 pb de la región LTR. El 58,1% (18/31) se incluyó dentro del subtipo Cosmopolita a; el 19,4% (6/31) en el Africano b; el 12,9% (4/31) en el Cosmopolita b, y el 9,6% (3/31) en el Africano c. Con base en análisis filogenéticos de secuencias nucleotídicas del 3'LTR, se demostró que los aislamientos colombianos incluidos en este trabajo se ubicaron dentro del subgrupo B o japonés, lo cual muestra gran divergencia con aquellos aislamientos de indígenas colombianos previamente reportados que se incluyeron dentro del subgrupo A o transcontinental. Nuestros datos apoyan la hipótesis de una introducción poscolombiana del HTLV-I a Colombia que estaría representada en las comunidades negras de la costa del Pacífico del sur de Colombia que tuvieron ancestros africanos. Algunos aislamientos virales de indígenas colombianos mostraron una variación nucleotídica compatible con una introducción paleolítica. En su conjunto, los resultados obtenidos permiten postular que la actual diversidad genética del HTLV-I en Colombia es compleja y es el resultado de varios eventos de introducción, temporalmente separados.

Palabras clave: virus linfotrópico, variación RFLP, dispersión viral, evolución.

Evolutionary and geographic origins of human lymphotropic virus in Colombia detected by RFLP polymorphisms

The human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection is a public health problem in many endemic areas of Colombia. The subtyping of HTLV-I was based on the analysis of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) in 3'LTR proviral DNA. From 31 HTLV-I isolates collected throughout Colombia, a RFLP analysis in a 737 bp 3'LTR fragment was performed. Fifty-eight percent (18/31) were identified as the Cosmopolitan subtype a, 19.4% (6/31) in the West African subtype b, 12.9% (4/31) in the Cosmopolitan subtype b and 9.6% (3/31) in the West African subtype c. The phylogenetic analysis of 3'LTR nucleotide sequences indicated that all the isolates in the current study were in the subgroup B or Japanese, in contrast with the highly divergent isolates from native Amerindians grouped in subgroup a or Transcontinental. The supported hypothesis was that of a post-Columbus introduction of virus represented in the African-American communities of the Colombian South Pacific. Some viral isolates from Colombian native Amerindians exhibited a nucleotide variation compatible with a Paleolithic introduction of the virus. The genetic diversity of HTLV-I in Colombia is complex and probably represents several independent introductions of lymphotropic virus.

Key words: lymphotropic virus, RFLP variation, virus dispersal, evolution

El virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) fue el primer retrovirus identificado en humanos, aislado de un paciente con linfoma cutáneo (1,2). Posteriormente, en 1982, se aisló el HTLV-II de un tipo de leucemia rara, conocida con el nombre de leucemia de células pilosas (3). En la actualidad, la infección por el HTLV-I está asociada con un gran número de trastornos clínicos. Sin embargo, se asocia epidemiológicamente con la leucemia de las células T del adulto (ATL) (4-6) y la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada con el HTLV-I (PET/MAH) (7-11). La infección por el HTLV-I es endémica en varias áreas geográficas del mundo y representa un problema global de salud pública (12-19).

Los análisis de secuencias de ADN y de proteínas se han convertido en instrumentos valiosos para el estudio de la historia evolutiva de los organismos. Dado que la tasa de evolución de las secuencias varía bastante con el gene o segmento de ADN, es posible estudiar las relaciones evolutivas a todos los niveles de clasificación de los organismos (20). Actualmente, es posible considerar la reconstrucción de una historia filogenética como una inferencia estadística de un verdadero árbol filogenético el cual es desconocido. Hay dos procesos involucrados en esta inferencia: estimación de la topología (patrón de ramificación del árbol) y estimación de la longitud de las ramas para cada árbol. Los métodos de inferencia filogenética generalmente se clasifican en tres grupos principales: métodos de probabilidad, métodos de parsimonia y métodos de distancia (21). La simulación computacional, además de los estudios teóricos, sugieren que los métodos utilizados como la distancia NJ (*neighbor joining*, unión de vecinos), MP (*maximum parsimony*, máxima parsimonia) y ML (*maximum likelihood*, máxima probabilidad) generan árboles filogenéticos con topologías razonablemente buenas.

Correspondencia:

Felipe García, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, apartado aéreo 25360, Cali, Colombia.
labiomol@hotmail.com

Recibido: 09/05/03; aceptado: 23/12/03

Además de que las pruebas estadísticas de remuestreo (*bootstrap*) producen datos de distancias genéticas con un grado muy alto de confianza estadística cuando se analizan secuencias relativamente largas (>200 pb) (22).

La hipótesis del reloj molecular es una consecuencia de la teoría neutral de la evolución la cual postula que para cualquier secuencia de ADN, las mutaciones se acumulan a tasas relativamente constantes siempre que la secuencia de ADN retenga su función original (23). La diferencia entre las secuencias de nucleótidos de un segmento de ADN o de proteína de dos especies pueden ser proporcionales al tiempo que ha transcurrido desde que estas dos especies divergieron a partir de un ancestro común (tiempo de coalescencia). Este tiempo se mide en unidades arbitrarias y, entonces, se puede calibrar en miles de años para una secuencia dada si existen registros fósiles de las especies que se puedan medir mediante métodos de datación química o biológica (24,25).

Con base en el análisis de polimorfismos en los tamaños de fragmentos de restricción (RFLP) (26) y de secuenciación de nucleótidos de las secuencias de las terminaciones repetidas largas del ADN proviral (LTR) (27), Vidal-Ureta *et al.* (28) propusieron una clasificación del HTLV-I en subtipos geográficos y moleculares: el subtipo I que circula en África occidental y Zaire, el subtipo II o cosmopolita de amplia distribución a nivel mundial, el subtipo III o japonés, el subtipo melanésico y el subtipo circulante en África central; además, estos análisis aportaron evidencias con relación con la estabilidad genética del HTLV-I.

En Colombia, inicialmente se relacionó la presencia del HTLV-I y las enfermedades asociadas con este virus, como la ATL y la PET/MAH, con individuos de raza negra habitantes de la Costa Pacífica colombiana; sin embargo, actualmente su distribución es amplia en todo el territorio nacional (29). Este estudio permitió obtener un conocimiento más detallado de la evolución del virus en zonas del suroccidente colombiano y en varias regiones del territorio colombiano donde la variación molecular del virus era totalmente desconocida. Se determinó que el

tipo molecular circulante fue el Cosmopolita dentro del cual se pudieron distinguir el subtipo Transcontinental y el de África occidental. Estos resultados permitieron tener una visión de la posible historia evolutiva del virus y de la variabilidad genética en esta zona colombiana en donde existen áreas endémicas de infección por el HTLV-I.

Materiales y métodos

Descripción de la muestra

Se incluyeron 31 muestras de sangre de individuos infectados con el HTLV-I pertenecientes a diferentes grupos étnicos (mestizos, negros e indígenas) de los municipios de Tumaco, Guapi y Buenaventura de la Costa Pacífica; además, Cali

y Palmira en Valle, Puerto Tejada en Cauca, Manizales en la zona andina, Bucaramanga en Santander y Montería y Moñitos en la región caribe del departamento de Córdoba (cuadro1). El Comité de Ética de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprobó el protocolo para la obtención de las muestras de los sujetos incluidos en este estudio. La seropositividad de las muestras de suero para HTLV-I se determinó por el método de aglutinación de partículas con el estuche Serodia-ATLA de Fujirebio o por ELISA y, posteriormente, se confirmaron por Western Blot (Abbot).

Extracción del ADN y protocolos de la PCR

El ADN de alto peso molecular de linfocitos de sangre periférica se extrajo con la técnica clásica

Cuadro 1. Descripción de las principales características epidemiológicas de los individuos seropositivos para HTLV-I de Colombia incluidos en este estudio.

Código	Sexo	Edad	Etnia	Estado clínico	Localidad
0001	M	35	Negra	PET/HAM	Costa Pacífica
0002	F	32	Negra	AC	Costa Pacífica
0003	M	33	Mestiza	AC	Interior del SO
0004	M	41	Mestiza	PET/HAM	Costa Pacífica
0005	F	41	Caucásica	AC	Interior del SO
0006	M	45	Negra	AC	Costa Pacífica
0007	F	32	Negra	AC	Costa Pacífica
0008	F	29	Mestiza	AC	Costa Pacífica
0009	M	60	Negra	ND	Costa Pacífica
0010	M	59	Caucásica	ATL	Santander
0011	M	32	Mulata	PET/HAM	Interior del SO
0012	F	62	Mestiza	PET/HAM	Interior del SO
0013	M	70	Negra	PET/HAM	Interior del SO
0014	M	34	Mestiza	AC	Región Andina
0015	F	56	Negra	PET/HAM	Costa Pacífica
0016	M	27	Negra	ATL	Costa Pacífica
0017	F	56	Caucásica	PET/HAM	Interior del SO
0018	F	57	Mestiza	PET/HAM	Antioquia
0019	F	42	Indígena	PET/HAM	Interior del SO
0020	M	62	Mestiza	AC	Interior del SO
0021	M	42	Negra	ND	Interior del SO
0022	F	53	Mestiza	PET/HAM	Interior del SO
0023	F	35	Mestiza	PET/HAM	Interior del SO
0024	M	37	Negra	PET/HAM	Costa Pacífica
0025	M	28	Negra	PET/HAM	Costa Pacífica
0026	F	31	Negra	PET/HAM	Interior del SO
0027	M	53	Indígena	PET/HAM	Costa Pacífica
0028	M	42	Caucásica	AC	Caribe colombiano
0029	M	58	Caucásica	AC	Caribe colombiano
0030	M	25	Mestiza	AC	Caribe colombiano
0031	F	39	Mestiza	AC	Caribe colombiano

PET/HAM: paraparesia espástica tropical/mieolopatía asociada con el HTLV-I; AC: portador asintomático; ND: no determinado. SO: suroccidente colombiano (Cali, Valle; Palmira, Valle; Puerto Tejada, Cauca)

de fenol cloroformo (30). Todos los ADN se sometieron a PCR con cebadores específicos para la región proviral LTR. Cada mezcla para la PCR contenía 1,5 µg de ADN, 0,2 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP), 10 µl de un tampón de reacción 10 veces concentrado, 25 mM de cada oligonucleótido cebador y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) en un volumen total de 100 µl. Para amplificar la región LTR de cada uno de los provirus de los individuos seropositivos, se utilizaron oligonucleótidos cebadores específicos para el HTLV-I y sondas adecuadas. Los oligonucleótidos cebadores empleados para amplificar la 3'LTR correspondieron al LTR1 (+) (31)-ACCATGAGCCC AAATATCCCC-(58) y al LTR2 (-) (768)-AATTT CTCTCCTGAGAGTGCTATA-(741). Se utilizó como sonda el oligonucleótido LTR3 (562-CATAAGCTAAGACCTCC-578). Todos los oligonucleótidos empleados en este estudio se sintetizaron teniendo como base las secuencias correspondientes del HTLV-I de la cepa referencia ATK-1. Las condiciones de PCR fueron: 5 minutos a 94°C seguidos de 30 a 40 ciclos a 94°C durante 2 minutos, 2 minutos a 55°C y 2 minutos a 72°C y un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos del PCR se caracterizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (agarosa ultrapura; Bethesda Research Laboratories). Todos los productos de PCR se hibridizaron por Southern Blot con la sonda LTR3.

Análisis de RFLP en la región LTR 3'

El segmento LTR de 737 pb se sometió a digestión con las enzimas de restricción Apa I y Nde I (Gibco, BRL), las cuales definen los perfiles de restricción para el subtipo I, Mae III (Promega) para el subtipo Cosmopolita y Sac I y Dra I (Gibco BRL) para el subtipo III (26, 27). Los fragmentos de restricción resultantes se separaron de acuerdo con su tamaño molecular en geles de agarosa del 2,0%. Se analizaron mediante la observación del patrón de bandas generadas y por comparación con la cepa prototipo MT-2.

Para definir la existencia de subtipos moleculares, la distribución geográfica y las relaciones filogenéticas de los aislamientos colombianos, se compararon entre sí y con secuencias previa-

mente publicadas del HTLV-I con el paquete Mega, versión 2.0, y el programa PAUP, versión 4.0 por medio del método de unión de vecinos (NJ).

Protocolos de clonación y secuenciación de ácidos nucleicos

El fragmento de 737 pb de la región LTR obtenido de cada uno de los aislamientos del HTLV-I se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 2%. Posteriormente, se empleó el estuche QiaGen® de elución de bandas según los procedimientos recomendados por los fabricantes. Cada uno de los fragmentos eluidos fue clonado en el sitio Hind III del vector pCR2.1 (Invitrogen®). Los clones recombinantes se seleccionaron de acuerdo con lo descrito por Sambrook *et al.* (30).

Para la secuenciación del fragmento de 737 pb de la región LTR, se escogieron tres clones recombinantes de once aislamientos del HTLV-I (001, 004, 010, 011, 013, 016, 018, 024, 027, 030 y 031); se utilizó el estuche *Big Dye Terminator* (QiaGen®), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La secuenciación se realizó empleando la metodología de secuenciación cíclica con un secuenciador automático AbiPrism serie 3700.

Secuencias utilizadas

Las secuencias de cada uno de los recombinantes obtenidos se consignaron en el GenBank; los códigos de acceso son los siguientes: 004-LTR (AY269827), 010-LTR (AY269828), 011-LTR (AY269829), 013-LTR (AY269830), 018-LTR (AY269831), 027-LTR (AY269832), 001-LTR (AY269833), 030-LTR (AY269834), 024-LTR (AY269835) y 031-LTR (AY269836). Con estas secuencias y otras que están consignadas en la cuadro 2, se hicieron tres análisis filogenéticos.

Análisis filogenético

Las secuencias nucleotídicas de la región LTR se alinearon con el programa Clustal W (31). Para el análisis filogenético molecular de cada una de las secuencias LTR, se emplearon tres algoritmos: la evolución mínima distancia-base (ME), la probabilidad máxima (ML) y la parsimonia máxima (MP) (20).

Cuadro 2. Número de acceso a la base de datos GenBank para las secuencias de la región LTR que se utilizaron en el análisis filogenético del HTLV-I.

Aislamiento LTR	Número GenBank	Origen geográfico	Aislamiento LTR	Número GenBank	Origen geográfico
BO	U12804	Argelia	ATK1	J02029	Japón
ARGDOU	AF007751	Argentina	H5	X88874	Japón
ARGFF	AF007752	Argentina	HAM284A	AB036349	Japón
ARGGAY	AF007753	Argentina	HC1020A	AB036348	Japón
ARGSOT	AF007754	Argentina	HC33B	AB036352	Japón
AMA	X88871	Brasil	HC57A	AB036350	Japón
BRASP08	AF014670	Brasil	HC5B	AB036353	Japón
BRASP21	AF014660	Brasil	HC66A	AB036351	Japón
BRASP22	AF014661	Brasil	HC7B	AB036354	Japón
BRASP23	AF014662	Brasil	MT2	Z31660	Japón
BRASP31	AF014663	Brasil	MT4	Z31661	Japón
BRASP51	AF014667	Brasil	TBH-5	L76027	Japón
FCR	X88873	Brasil	PR144	U12807	Marruecos
JCP	X88875	Brasil	PR52	U12806	Marruecos
MAQS	X88876	Brasil	MEL5	L02534	Melanesia
MASU	X88877	Brasil	BI2	Y16482	Perú
CH26	D23690	Chile	BI3	Y16783	Perú
col001	D82946	Colombia	Me1	Y16478	Perú
col001A	D82946	Colombia	Me2	Y16479	Perú
col013	D82947	Colombia	Me3	Y16480	Perú
col013B	D82947	Colombia	Ni1	Y16484	Perú
col084	D82948	Colombia	Ni2	Y16485	Perú
col084C	D82948	Colombia	Ni3	Y16486	Perú
col433	D82949	Colombia	Qu1	Y16475	Perú
col433D	D82949	Colombia	Qu2	Y16476	Perú
SIB170B	D23691	Colombia	Qu3	Y16477	Perú
SIB190E	D82950	Colombia	TBH-1	L76026	Suráfrica
SIB220F	D82951	Colombia	TBH-2	L76025	Suráfrica
HS35	D00294	Jamaica	EL	S74562	Zaire
AINU	D23694	Japón			

Evaluación del reloj molecular

La hipótesis del reloj molecular para cada agrupamiento en particular, de interés en cada uno de los conjuntos de secuencias LTR, se evaluó por medio de la prueba de proporción de probabilidad (*likelihood ratio test* o LRT) (32,33).

Para los análisis estadísticos de los resultados, se aplicó la prueba exacta de Fisher para establecer la relación entre la distribución geográfica, el sexo y el estado clínico de los pacientes con los subtipos encontrados en este estudio.

Resultados

Genotipos moleculares

Los patrones de restricción Apa I, Mae II, Nde I y Sac I del fragmento de 737 pb del 3'LTR revelaron

que los 31 aislamientos colombianos pertenecían al linaje Transcontinental. Con base en lo que se muestra en la cuadro 3, el 71% (22/31) de los aislamientos se agrupó en el subtipo Cosmopolita mientras que el 29% (9/31) se incluyó en el subtipo Africano Occidental. El cuadro 3, además, resume los patrones de restricción obtenidos del fragmento 737 bp 3'LTR y la clasificación en subtipos de los 31 aislamientos HTLV-I provirales incluidos en el presente estudio.

Características étnicas y geográficas de los subgrupos moleculares

Los genotipos Africano Occidental b y c se encontraron muy concentrados en las regiones de la Costa Pacífica en contraste con los genotipos Cosmopolita a y b que fueron más prevalentes en otras regiones no costaneras del

Cuadro 3. Genotipos moleculares de los aislamientos del HTLV-I de Colombia obtenidos mediante análisis de RFLP en un segmento proviral de 701 pares de bases de la región 3'LTR.

Patrones de restricción					Código de la muestra	Genotipo molecular*	Subtipo**
Apa I	Nde I	Mae III	Dra I	Sac I			
-	-	+	-	+	001, 002, 016, 025, 030, 031	Africano Occidental b	Cosmopolita
+	+	+	-	+	024, 006, 009	Africano Occidental c	Cosmopolita
+	+	-	-	+	003, 004, 005, 007, 008, 011, 012, 013, 014, 015, 017, 019, 020, 021, 022, 023, 026, 027,	Cosmopolita a	Cosmopolita
+	+	-	+	-	018, 010, 028, 029	Cosmopolita b	Cosmopolita

(+): presencia del sitio para la endonucleasa de restricción; (-): ausencia del sitio para la endonucleasa de restricción.

(*) De acuerdo con Miura *et al.* (34). (**) De acuerdo con Gessain *et al.* (35).

suroccidente y en las regiones centrales del interior. En la región noroccidental del Caribe colombiano se encontró una distribución igual de los genotipos Africano y Cosmopolita. En este estudio, 35,5% (12/31) de las personas eran de etnia negra; de éstas, el 58,3% (7/12) de los aislamientos de HTLV-I correspondió a genotipos Africanos y el 41,7% al genotipo Cosmopolita. En contraste, el 35,4% (11/31) de los individuos incluidos eran mestizos; de ellos, 90,9% (10/11) tenía un genotipo Cosmopolita ($p=0,0187$).

Análisis filogenético de la región LTR

El alineamiento de una región de 664 pb de once secuencias LTR obtenidas de diferentes aislados de Colombia mostró un porcentaje equivalente de nucleótidos A, G, C y T (25%). En total, se registraron 39 sustituciones puntuales cuyas frecuencias fueron: A→T (10/39), C→T (8/39), C→G (7/39), A→C (6/39), A→G (5/39) y T→G (3/39); la relación de transición/transversión fue de 2,00.

El análisis filogenético de la región LTR usando los tres diferentes métodos, mostró agrupaciones con topologías muy similares. Con base en el árbol filogenético NJ que se muestra en la figura 3, se observó que el subtipo Cosmopolita o HTLV-Ia está separado de los subtipos HTLV-Ib, HTLV-Ic y HTLV-Id con valores de *bootstrap* de 74% para

NJ y de 86% para MP. Dentro del subtipo Cosmopolita o HTLV-Ia, se identificaron cuatro subgrupos: el subgrupo C o del África Occidental/ Caribe; el subgrupo D o África del Norte; el subgrupo B o Japonés que, además, contiene los aislados obtenidos del Pacífico colombiano (Tumaco y Buenaventura), aislamientos de Brasil y aislamientos de Perú; y el subgrupo A o Transcontinental que incluyó varios aislamientos de Norte y Suramérica, Suráfrica y Japón y los aislamientos de nativos colombianos de Guapi, Aponte y Sibundoy, además del nuevo subgrupo E o de negros peruanos.

Los aislamientos colombianos incluidos en este trabajo se ubicaron dentro del subgrupo B o japonés y mostraron gran divergencia con aquellos aislamientos de indígenas colombianos previamente reportados que se incluyeron dentro del subgrupo A o Transcontinental. Este nuevo agrupamiento de aislamientos del Pacífico colombiano (001, 004, 010, 011, 013, 016, 018, 024, 027, 030 y 031) incluidos dentro del subgrupo Japonés presentó valores de *bootstrap* de 100% para NJ y 99% para MP.

Con relación a los aislamientos provenientes de diferentes áreas de Colombia, se determinó que el subtipo HTLV-Ia o Cosmopolita fue el menos divergente (5,6%±0,8). El aislamiento prototipo

		37					
MT2	LTR	CCCCTTTTCG	GAACCTGTCC	CTGACGTGTC	CCCCCGAAGA	CATTTTCATAA	GCTCAGACCT
004	LTR	G....			T....		.G...AG...
010	LTR	G....	G.	-.....	T....	A....	G...AG...
011	LTR	G....			T....		G...AG...
013	LTR	G....	G.		T....	A....	
018	LTR	T....	CC..		T....		
027	LTR	G....	G.	-.....	T....	A....	
030	LTR	G....			T....		.G...AG...
001	LTR	T....	CC..		T....		
016	LTR	T....	CC..		T....		
024	LTR	T....	..T...CC..		T....	G....	
031	LTR		G.		T....	C....	
MT2	LTR	CCGGGAAGCC	ACCGGAACC	ACTCATTTC	ATCCCATGTT	TGTCAAGCCG	TCCTCAGGCG
004	LTR			.C...C..			
010	LTR			.A....			
011	LTR			.C...C..			
013	LTR			.C....			
018	LTR			.C....	T....		
027	LTR			.A....			
030	LTR			.C...C..			
001	LTR			.C....	T....		
016	LTR			.C....	T....		
024	LTR			.C....	T....		
031	LTR			.C....			
MT2	LTR	TTGACGACAA	CCCCTCACCT	CAAAAAACTT	TTCATGGCAC	GCATATGGCT	CAATAAACTA
004	LTR						
010	LTR						
011	LTR						
013	LTR						
018	LTR						
027	LTR						
030	LTR						
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR			T....			
031	LTR						
MT2	LTR	ACAGGAGTCT	ATAAAAGCGT	GGAGACAGGT	CAGGAGGGGG	CTCGCATCTC	TCCTTCACGC
004	LTR						
010	LTR						
011	LTR						
013	LTR					T....	
018	LTR		...TTC...				
027	LTR						
030	LTR		...TTC...				
001	LTR		...TTC...				
016	LTR		...TTC...				
024	LTR		...T.C...				
031	LTR					T....	
MT2	LTR	GCCCGCCGCC	CTACCTGAGG	CCGCCATCCA	CGCCGGTTGA	GTCGCGTTCT	GCCGCCTCCC
004	LTR						
010	LTR						
011	LTR						
013	LTR			.G....	C....		
018	LTR						
027	LTR						
030	LTR						
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR			.G....	C....		
031	LTR				C....		
MT2	LTR	GCCTGTGGTG	CCTCCTGAAC	TGCGTCCGCC	GTCTAGGTAA	GTTTAAAGCT	CAGGTCGAGA
004	LTR						
010	LTR						
011	LTR						
013	LTR						
018	LTR						
027	LTR						
030	LTR						
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR			.C....			
031	LTR						
MT2	LTR	CCGGGCCTTT	GTCCGGCGCT	CCCTTGGAGC	CTACCTAGAC	TCAGCCGGCT	CTCCACGCTT
004	LTR		C....				

010	LTR						
011	LTR		C.....				
013	LTR						
018	LTR						
027	LTR						
030	LTR		C.....				
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR						
031	LTR				G.....		
MT2	LTR	TGCCTGACCC	TGCTTGCTCA	ACTCTACGTC	TTTGTTCGT	TTTCTGTTCT	GCGCCGTTAC
004	LTR						G.....
010	LTR			A.....			
011	LTR						G.....
013	LTR						
018	LTR						
027	LTR			A.....			
030	LTR						G.....
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR						
031	LTR		A.....				
MT2	LTR	AGATCGAAAG	TTCCACCCCT	TTCCCTTTCA	TTCACGACTG	ACTGCCGGCT	TGGCCACGG
004	LTR						
010	LTR				T.....	G.....	
011	LTR						
013	LTR				C.....		
018	LTR						
027	LTR				T.....	G.....	
030	LTR						
001	LTR						
016	LTR						A.....
024	LTR						
031	LTR	T.....		C.....			
MT2	LTR	CCAAGTACCG	GCGACTCCGT	TGGCTCGGAG	CCAGCGACAG	CCCATCCTAT	AGCACTCTCA
004	LTR	C.....					
010	LTR						
011	LTR	C.....					
013	LTR			A.....			
018	LTR					A.....	
027	LTR						
030	LTR	C.....					
001	LTR					A.....	
016	LTR					A.....	
024	LTR					A.....	
031	LTR			A.....			
MT2	LTR	GGAGAGAAAT	TAAAGCCGAA	TTNTGCAGAT	ATCATCAACT	GGCGCCGGT	CGAGCATGCA
004	LTR		A.....				
010	LTR						
011	LTR		A.....				
013	LTR						
018	LTR			GA.....	C.....		
027	LTR						
030	LTR		A.....				
001	LTR			GA.....	C.....		
016	LTR			GA.....	C.....		
024	LTR			GA.....	C.....		
031	LTR			C.....			
713							
MT2	LTR	TCTAGAGGCC	CAATTC				
004	LTR						
010	LTR						
011	LTR						
013	LTR						
018	LTR						
027	LTR						
030	LTR						
001	LTR						
016	LTR						
024	LTR						
031	LTR						

Figura 1. Alineamiento de una región de 664 pb de secuencias LTR de aislamientos del HTLV-I provenientes de diferentes áreas de Colombia.

MT2: cepa prototipo del HTLV-I

ATK-1 que se incluyó dentro de este subtipo A Transcontinental fue el que presentó menor divergencia con relación a los aislamientos de Tumaco y Buenaventura ($4,7\% \pm 0,3$). En contraste, la distancia genética NJ calculada para los aislamientos de Tumaco y Buenaventura con otros colombianos previamente publicados provenientes de nativos de comunidades indígenas fue de $6,6\% \pm 0,3$.

Análisis del reloj molecular en la región LTR

Para evaluar el reloj molecular de la región LTR, se tomó como punto de partida los 4 nodos que se obtuvieron en el análisis NJ y que se muestran en el árbol filogenético de la figura 2. Los análisis de evaluación del reloj molecular revelaron una tasa constante de evolución dentro del agrupamiento Japonés y el latinoamericano del subgrupo Transcontinental. La longitud de rama (calculada en el árbol MLK) de la cadena aislada en particular para el nodo raíz del agrupamiento Japonés (nodo A) fue de 0,01160, diferente a la longitud de rama de la cadena aislada en particular para el nodo raíz del agrupamiento Latinoamericano (nodo C) que fue de 0,00417 con una significancia de $p < 0,01$.

Para calibrar el reloj molecular se utilizaron dos diferentes periodos de tiempo para las fechas históricas de divergencia dentro de los agrupamientos que aceptaron la hipótesis del reloj molecular. El primer periodo representa la radiación del grupo HTLV-Ia hace unos 12.700 años (33), fecha que se encontraría dentro del rango establecido por los intervalos de las fechas históricas de la introducción paleolítica. Con base en este referencial de tiempo, se calculó en $9,13 \times 10^{-7}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años la tasa evolutiva del HTLV-I para el agrupamiento japonés y para el agrupamiento latinoamericano $3,28 \times 10^{-7}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años. Cuando se consideró el nodo D, se calculó una tasa evolutiva alrededor de $8,23 \times 10^{-7}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años.

El segundo periodo utilizado para calibrar el reloj molecular de la región LTR fue el correspondiente a las migraciones humanas poscolombianas entre África y Latinoamérica o Asia, hace unos 500 a 100 años. El correspondiente rango de tasa

evolutiva fue de $2,9 \times 10^{-5}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años para el agrupamiento japonés y $1,04 \times 10^{-5}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años para el agrupamiento latinoamericano. Al considerar la misma divergencia entre los dos agrupamientos (nodo D), se encontró una tasa evolutiva alrededor de $2,6 \times 10^{-5}$ sustitución de nucleótidos/sitio/años.

Discusión

En este trabajo se analizaron genéticamente muestras de HTLV-I procedentes del suroccidente colombiano y de la región Caribe del departamento de Córdoba; los resultados obtenidos mostraron la epidemiología molecular del HTLV-I en la que es una característica especial la existencia de una agregación geográfica para algunos genotipos moleculares del virus.

Estudios previos demuestran que el análisis por RFLP (principalmente en el 3'LTR) es una poderosa herramienta molecular para diferenciar genéticamente los aislamientos de HTLV-I (26-27), además de ser adecuado para analizar un número grande de aislamientos por su bajo costo y rapidez. Aunque en Colombia, al igual que en otras regiones de Suramérica, el subtipo Cosmopolita ha sido el más prevalente, en este trabajo se caracterizaron subgrupos genéticos minoritarios lo cual sugiere una estructura compleja de las poblaciones virales posiblemente debida a las rutas diferentes de introducción del virus HTLV-I a nuestras poblaciones.

La estructura genética actual de la población colombiana es multiétnica y muy compleja (36,37). Las comunidades de la Costa Pacífica colombiana tienen una alta prevalencia de individuos descendientes de africanos, quienes poblaron esta región durante la Colonia y en especial en el siglo XIX después de la liberación de los esclavos consignada en el texto de la constitución de la república de Colombia promulgada en 1863. La mayoría de estos individuos conformaron comunidades aisladas durante largos periodos, favorecidas no sólo por condiciones ecológicas sino de pobres vías de comunicación, gobiernos centralistas y factores culturales.

Un hallazgo interesante de este estudio fue la circulación en Buenaventura no sólo del HTLV-I

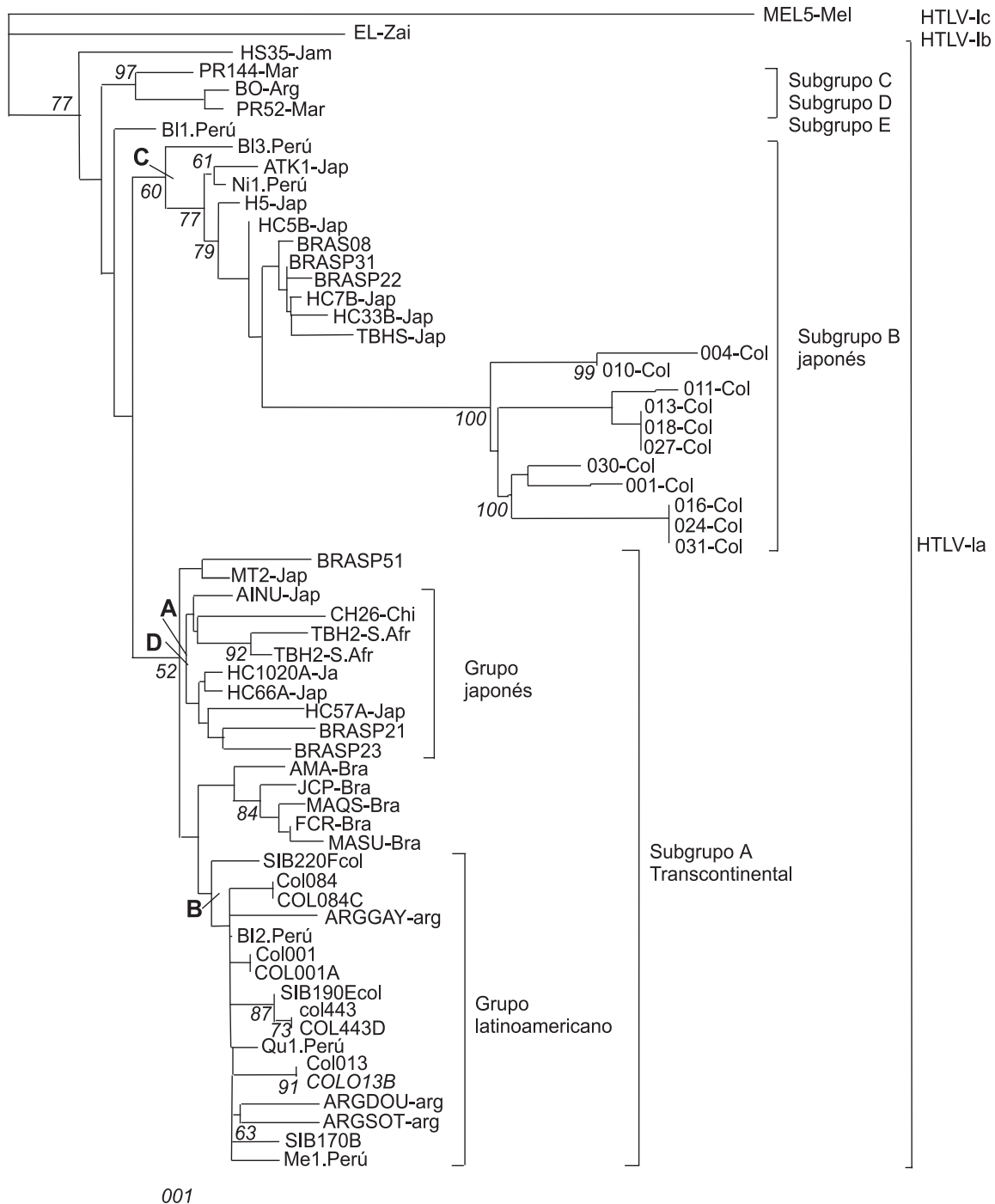


Figura 2. Árbol filogenético NJ de secuencias LTR de diferentes aislamientos del HTLV-I de distintas áreas del mundo, incluso los provenientes de Colombia. Los códigos corresponden a los números de acceso a la base de datos del GenBank descritos en el cuadro 2. Los números al pie de cada rama son los valores de *bootstrap* calculados mediante NJ y ML, respectivamente. Las letras en mayúscula en el origen de cada nodo corresponden a los grupos de aislamientos que se incluyeron para la evaluación del reloj molecular de la región LTR.

Cosmopolita a y b sino de los subtipos Africanos anotados. Este hallazgo contrasta con otras poblaciones como Tumaco que estuvo aislada del resto del país por muchos años, en donde sólo se observaron los genotipos africanos del subtipo Cosmopolita, resultado que sustenta los obtenidos anteriormente (38-40).

El análisis de la región LTR efectuado en el presente trabajo, nos permite postular que tanto el subgrupo Transcontinental como el subgrupo Japonés, no están agrupados con relación a los demás subgrupos que conforman el HTLV-Ia; esto sugiere de nuevo un posible origen africano para estos dos subgrupos. Lo anterior es importante porque el agrupamiento de los aislamientos del Pacífico colombiano incluidos dentro del subgrupo Japonés, provengan indirectamente de un origen africano.

Con base en las tasas de mutación de secuencias LTR (10^{-5} a 10^{-2} sustitución de nucleótidos/sitio/años) y los cálculos del reloj molecular obtenidos por Salemi *et al.* (33) para el grupo de los virus linfotrópicos de primates (PTLV) fue posible definir que los aislamientos del Pacífico colombiano tienen un tiempo de divergencia de 500 a 100 años el cual es coincidente con eventos de introducción poscolombina. Posiblemente, esta diversificación en el periodo poscolombino ocurrió a través de introducciones temporalmente espaciadas provenientes del continente africano. En este sentido, proponemos que el HTLV-I vino de África, pasó por las islas del Caribe, Jamaica en especial, para después llegar al sur de la Costa Pacífica y de allí diseminarse a otras regiones del Pacífico colombiano.

En contraste con lo que se ha determinado para los aislamientos de la Costa Pacífica, los resultados del reloj molecular para los actuales genotipos moleculares del HTLV-I de las regiones del interior de Colombia son compatibles con la propuesta de que algunos de estos aislamientos hubiesen sido introducidos en periodos anteriores al descubrimiento de América. De otra parte, confirman y amplían la concepción de que los aislamientos del HTLV-I que pertenecen al grupo Cosmopolita serían el resultado de migraciones asiáticas precolombinas que establecieron la

mezcla genética entre negros e indígenas de Suramérica durante la colonización.

Puesto que la región LTR aceptó en la mayoría de los agrupamientos la hipótesis de reloj molecular, apoyaría la explicación que su tasa general de mutación no estaría condicionada por selección natural. Este hecho es fundamental ya que explicaría que el mecanismo de evolución de las secuencias LTR de los virus colombianos sería el producto de cambios neutrales que fijarían por deriva genética ciertas secuencias virales. Estos resultados hacen que las secuencias LTR sean eficientes marcadores moleculares para analizar no solamente la filogenia del HTLV-I sino los movimientos migratorios de grupos humanos.

Agradecimientos

A Ángela García por su labor secretarial; a Jesús Cabrera por sus críticas y sugerencias a este trabajo. Este proyecto fue ejecutado con fondos de Colciencias y la Universidad del Valle (proyecto número 1106-04-199-96). También como parte del convenido de cooperación entre la Universidad del Valle y el Centro de Enfermedades Crónicas Virales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kagoshima de Japón. Este trabajo se efectuó siguiendo las normas de bioseguridad de nivel P2.

Referencias

1. **Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazder AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC.** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7415-9.
2. **Bentrem DJ, McGovern EE, Hammariskjold MI, Erdlich RF.** Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) retrovirus and human disease. *J Emerg Med* 1994;21:825-32.
3. **Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Gurroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC.** A new subtype of human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 1982;218:571-3.
4. **Gallo RC, Wong-Staal R.** Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemia and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood* 1982;60:545- 57.
5. **Chou KS, Okayama A, Tachibana N, Lee TH, Essex M.** Nucleotide sequence analysis of a full-length human-

- T-cell leukemia virus type I from adult-cell leukemia cells: a prematurely terminated open reading frame II. *Int J Cancer* 1995;60:701-6.
6. **Zucker FD, Pancake B.** The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Sem Dermatol* 1994;13:160-5.
 7. **Rodger-Johnson PE.** Tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. Etiology and clinical Spectrum. *Mol Neurobiol* 1994;8:175-9.
 8. **Casseb J, Penalva de Oliveira AC.** The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Sci* 2000;33:1395-1401.
 9. **Jacobson S, Raine CS, Mingioli ES, McFarlin DE.** Isolation of an HTLV-1 like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis. *Nature* 1988;331:540-3.
 10. **Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, et al.** HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986;1:1031-2.
 11. **Mckhann G 2nd, Gibbs CJ, Mora CA, Rodgers-Johnson PE, Liberski PP, Gdula WJ, et al.** Isolation and characterization of HTLV-I from symptomatic family members with tropical spastic paraparesis (HTLV-I-encephalomyeloneuropathy). *J Infect Dis* 1989;160:371-9.
 12. **Zaninovic V, Biojó R, Barreto P.** Paraparesia espástica del Pacífico. *Col Médica* 1981;12:111-7.
 13. **Edlich RF, Hill LG, Williams FM.** Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. *J Long Term Eff Med Implants* 2003;13:127-40.
 14. **Edlich RF, Arnette JA, Williams FM, Edlich RF, Arnette JA, Williams FM.** Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med* 2000;18:109-19.
 15. **Gessain A, Mahieux R.** A virus called HTLV-1. Epidemiological aspects. *Presse Med* 2000;29:2233-9.
 16. **Gotuzzo E, Arango C, de Queiroz-Campos A, Isturiz RE.** Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14:211-39.
 17. **Slattey JP, Franchini G, Gessain A.** Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res* 1999;9:525-40.
 18. **Zaninovic V.** On the etiology of tropical spastic paraparesis and human T-cell lymphotropic virus-I associated myelopathy. *Int J Infect Dis* 1999;3:168-76.
 19. **de Oliveira MS, Hamerschlag N, Chiatton C, Loureiro P.** HTLV-I infection and adult T-cell leukemia in Brazil: an overview. *Rev Paul Med* 1996;114:1177-85.
 20. **Nei M.** Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet* 1996;30:371-403.
 21. **Hasegawa M, Fujiwara M.** Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum-parsimony and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny. *Mol Phy Evol* 1993;2:1-5.
 22. **DeBry RW.** The consistency of several phylogeny-inference methods under varying evolutionary rates. *Mol Biol Evol* 1992;9:537-51.
 23. **Gojobori T, Moriyama EN, Kimura M.** Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:10015-8.
 24. **Hasegawa M, Thorne JL, Kishino H.** Time scale of eutherian evolution estimated without assuming a constant rate of molecular evolution. *Genes Genet Syst* 2003;78:267-83.
 25. **Li WH, Tanimura M, Sharp PM.** An evaluation of the molecular clock hypothesis using mammalian DNA sequences. *J Mol Evol* 1987;25:330-42.
 26. **Komurian-Pradel F, Pelloquin F, Sonoda S, Osame M, De The G.** Geographic subtypes demonstrated by RFLPs following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Retroviruses* 1992;8:429-34.
 27. **Komurian F, Pelloquin F, De The G.** In vivo genomic variability of the human T-cell virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J Virol* 1991;65:3770-8.
 28. **Vidal AU, Gessain A, Yoshida M, Tekaiia F, Garin B, Guillemain B, et al.** Phylogenetic classification of human T-Cell leukemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *J Gen Virol* 1994;75:3655-6.
 29. **Arango C, Concha M, Zaninovic V, Corral R, Biojó R, Borrero I, Rodgers-Johnson P, et al.** Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Ann Neurol* 1988;23:S161-5.
 30. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring: Harbor Press; 1989.
 31. **Thompson J, Higgins D, Gibson T.** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1980;39:783-91.
 32. **van Dooren S, Gotuzzo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, Duwe S, et al.** Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Gen Virol* 1998;79:2695-708.
 33. **Salemi M, Desmyter J, Vandamme AN.** Tempo and mode of human and simian T-lymphotropic virus (HTLV/STLV) evolution revealed by analyses of full genome sequences. *Mol Biol Evol* 2000;17:374-86.
 34. **Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi I, Ishida T, et al.** Phylogenetic subtypes

- of T-lymphotropic virus type I and their relations to the antropological background. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1124-7.
35. **Gessain A, Koralnik IJ, Fullen J, Boeri E, Mora C, Blamk A, Salazar-Grueso EF, *et al.*** Phylogenetic study of ten new HTLV-I strains from the Americas. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:103-6.
36. **Jaramillo-Correa JP, Keyeux G, Ruiz-García M, Rodas C, Bernal J.** Population genetic analysis of the genes APOE, APOB(3'VNTR) and ACE in some black and Amerindian communities from Colombia. *Hum Hered* 2001;52:14-33.
37. **Mesa NR, Mondragón MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, *et al.*** Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerindians: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet* 2000;67:1277-86.
38. **Domínguez MC, Castillo A, Cabrera J, Eizuru Y, Akiba S, García-Vallejo F.** Envelope sequence variation and phylogenetic relations of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type I from endemic areas of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:887-90.
39. **García-Vallejo F, Chávez M, Domínguez MC, Blank A.** Microagregación genética y geográfica de aislados del virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) en zonas endémicas del suroccidente de Colombia. *Colombia Médica* 2000;31:110-7.
40. **Balcázar N, Sánchez G, García-Vallejo F.** Sequence and phylogenetic analysis of human T-lymphotropic virus type 1 from Tumaco, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:641-8.