

## Microagregación genética y geográfica de aislados del virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) en zonas endémicas del suroccidente de Colombia<sup>1</sup>

Felipe García, Ph.D.<sup>2</sup>, Mónica Chávez, M.Sc.<sup>3</sup>, Martha Cecilia Domínguez, M.Sc.<sup>4</sup>, Abraham Blank, M.D.<sup>5</sup>

### RESUMEN

Con el objetivo de definir el polimorfismo de patrones de restricción (RFL) para la endonucleasa de restricción DdeI, de la región del HTLV-I de los 5181 a los 6624 nucleótidos, se amplificó un segmento de 1033 bp que incluía la porción terminal 5' del gen Pol y el dominio de superficie del gen Env (gp46) del ADN proviral de PBMC obtenido de 29 personas seropositivas para el HTLV-I provenientes de varias zonas el suroccidente de Colombia. El análisis de restricción efectuado con la endonucleasa DdeI, reveló la existencia de tres patrones de RFLPs diferentes. El patrón I (900 y 125 pb), se observó en 34.5% (10/29) de los aislados. El patrón IIa (700, 205 y 125 pb) se determinó en 51.7% (15/29). Finalmente, el patrón IIb (550, 350 y 125 pb) representó 13.8% (4/29) aislados. El microagregado IIb se observó con predominio en aislados de HTLV-I del municipio de Tumaco. Los patrones I y IIa se distribuyeron con mayor frecuencia en el interior del suroccidente. Los resultados obtenidos muestran la existencia de un mecanismo de microevolución divergente de la región pol-env en los virus de las áreas analizadas.

Palabras claves: HTLV-I. Análisis por RFLP. Variación genética. Microevolución. Distribución geográfica.

El virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) fue el primer retrovirus identificado en seres humanos, que se aisló de un paciente con linfoma cutáneo<sup>1,2</sup>. En la actualidad se relaciona con varios desórdenes clínicos. Sin embargo, las asociaciones epidemiológicas más rigurosas correlacionan la infección por el HTLV-I con la leucemia de las células T del adulto (ATL)<sup>3,4</sup> y la paraparesia espástica tropical/mielopatía asociada con el HTLV-I (PET/HAM)<sup>5-9</sup> en las zonas endémicas para la infección por el virus.

La infección con el HTLV-I, es endémica en varias áreas geográficas alrededor del mundo que incluyen Asia, el suroeste de Japón<sup>10,11</sup> y la cuenca del Caribe<sup>12,13</sup>. En América del Sur<sup>14,15</sup>, en

regiones de Chile<sup>16</sup>, Brasil<sup>17</sup> y Colombia<sup>18-22</sup> entre otras, se registran zonas de prevalencia media y alta. En África Occidental y Central se han descrito zonas endémicas<sup>23,24</sup>; también en las Islas Seychelles<sup>25</sup>, Papúa Nueva Guinea e Islas Solomón<sup>26</sup>, Australia<sup>27</sup>, Taiwan<sup>28</sup>, India<sup>29</sup>.

En general, se observa que el genoma retroviral exhibe una mayor variación en las regiones LTRs (1.3%-5.2%), seguida por la registrada en los genes gag (1.1%-2.9%), pol (0.9%-2.5%) y env (0.9%-2.4%)<sup>30</sup>; es importante anotar que estas variaciones generan nuevas cepas que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes dirigidos principalmente contra polipéptidos codificados por estos genes. De otra parte, se

informa una menor variabilidad para los genes transregulatorios rex y tax<sup>31,32</sup>.

Los análisis filogenéticos a los aislados del HTLV-I tanto de Suramérica como de la cuenca del Caribe sugieren una fuente común de la infección por este virus<sup>33,34</sup>. Sin embargo, los presentes sobre todo en nativos indígenas de Chile y negros de Colombia, muestran una variación muy sutil en relación con la de otras áreas del Caribe y Suramérica; este proceso ha facilitado el establecimiento de microagregados genéticos<sup>12</sup>.

Un estudio de Miura *et al.*<sup>33</sup> en cepas circulantes de poblaciones peruanas, determinó la presencia del tipo cosmopolita, dentro del que se destacaron los subtipos transcontinentales en mestizos y en "quechuas" lo mismo que en amerindios colombianos. Sin embargo, el subtipo japonés se determinó en comunidades "nissei" de ascendencia japonesa, mientras que en negroides y algunos mulatos de origen africano se encontraron las cepas virales más heterogéneas que se clasificaron en el subtipo de África Occidental (C), del África del Norte (D) y un nuevo subtipo denominado provisionalmente subtipo

1. Trabajo financiado parcialmente por la Fundación Fogarty/NIH de los Estados Unidos y COLCIENCIAS, Donación 1106-04-199-96.
2. Profesor Titular, Director del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali. E-mail: labiomol@hotmail.com
3. Investigadora Asociada. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira.
4. Investigadora Asociada, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Salud, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
5. Profesor Titular, Departamento de Morfología, Laboratorio Sasakawa, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali. E-mail: ablank@norma.net

E. Además, en este estudio, se sugiere que estas cepas son el producto de una reciente introducción (100 a 400 años) del virus a Latinoamérica.

En Tumaco, municipio del sur de la costa colombiana sobre el Océano Pacífico, se han realizado estudios con el fin de determinar los cambios genéticos de los virus circulantes con análisis de las mutaciones puntuales en las secuencias de nucleótidos de los genes Tax, LTR<sup>32</sup> y env<sup>19</sup>. En todos ellos se encontró la existencia de microagregados de cepas virales que circularon durante varios años entre estos vecinos. Infortunadamente, en otras zonas colombianas endémicas para el HTLV-I no se tienen datos sobre los procesos de microevolución que operan ni de la existencia de microagregados.

El presente estudio se diseñó para analizar el proceso de microagregación genética y definir la existencia de microagregados geográficamente excluyentes en áreas endémicas de la infección por el virus tanto costaneras como interiores del suroccidente colombiano. A fin de lograr los objetivos propuestos, se hizo un estudio filogenético a una muestra que incluía aislados virales circulantes en distintas áreas del suroccidente colombiano. Se efectuó un análisis de polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) para varias endonucleasas de restricción de clase 2 en un segmento de ADN proviral que incluía porciones de los genes pol y env. Los resultados mostraron por primera vez, en la región del suroccidente colombiano, la existencia de un mecanismo de microagregación genética y geográfica en los aislados del virus que circulan en esta área.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**La muestra.** Se emplearon muestras de linfocitos de sangre periférica

(PBMC), de pacientes de la clínica de HTLV-I en el Hospital Universitario del Valle que aceptaron participar en el estudio. Estos provenían de diferentes áreas geográficas del suroccidente de Colombia, como poblaciones de la costa pacífica colombiana, centro del departamento del Valle del Cauca, y en los departamentos del Cauca, Nariño y Putumayo. En este estudio se incluyeron un total de 29 individuos pertenecientes a diferentes grupos étnicos (mestizos, negros e indígenas), tanto asintomáticos como con alguna de las dos enfermedades más comunes asociadas con la infección por el virus (ATL o PET/HAM). Además, se analizaron dos aislados provenientes de los municipios de Marinilla (Antioquia) y de Girón (Santander) para comparar, de forma general, el patrón de agregación geográfica. La seropositividad de todas las muestras se determinó tanto por el método de aglutinación de partículas (PA), con el estuche Serodiatla (Fujirebio, Tokio, Japón), como por la prueba de ELISA (Abbott) y luego se confirmaron por Western blot (Abbott, Chicago, EE.UU.). A todas las muestras se les practicó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) confirmatoria con oligonucleótidos cebadores que amplifican una región de 189 pb del gen pol del HTLV-I.

**Extracción de ADN a partir de PBMC.** Los mononucleares periféricos (PBMC) de cada una de las personas incluidas en el presente estudio se obtuvieron mediante centrifugación en gradientes de ficoll hipaque y luego se lisaron por tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, NaCl 1M y proteinasa K (2 mg/ml). El conjunto se incubó toda la noche a 56°C. El ADN se extrajo con la técnica de Sambrook *et al.*<sup>35</sup> La concentración y el grado de pureza de cada preparación de ADN se determinaron por espectrofotometría<sup>35</sup>.

Para extraer el ADN de cada una de las muestras se tomaron precauciones estrictas con el fin de evitar contaminación; la extracción se efectuó en la totalidad de las muestras y su cuantificación estuvo en un rango de 500-750 ng/μl, con un grado de pureza de 1.7 ( $A_{260}/A_{280} \geq 1.8 \pm 0.2$ ) suficiente para efectuar una buena amplificación por PCR.

**Amplificación por PCR del ADN proviral del HTLV-I.** Inicialmente se efectuó una reconfirmación por PCR de las muestras del HTLV-I evaluadas serológicamente amplificando un fragmento de 189 pb del gen pol con cebadores específicos. Las muestras de ADN reconfirmadas por la PCR específica para HTLV-I, se utilizaron a fin de amplificar un segmento de 1033 bp de la región pol-env, empleando para ello oligonucleótidos cebadores específicos, en un termociclador (Perkin-Elmer Cetus, 4800) (Figura 1). Los distintos procedimientos de PCR se efectuaron desnaturalizando el ADN por 5 min a 96°C seguido de 35 ciclos que incluían un paso de desnaturalización por 1 minuto a 94°C, uno de alineamiento específico para cada par de cebadores a 50°C, uno de extensión a 72°C por 2 min; por último, se efectuó un ciclo adicional de extensión a 72°C por 10 minutos. Se emplearon 10 μl de cada producto de PCR para visualizar los amplicones obtenidos de acuerdo con su tamaño molecular (1033 pb), con electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 2). El amplicón de 1033 bp de cada individuo se purificó con el estuche Gen Clean (USB) y después se le trató con las enzimas de restricción Hind III, Bam HI, Pst I, Pvu II y Dde I (GIBCO BRL) en las condiciones recomendadas por los fabricantes. Los fragmentos de restricción obtenidos se separaron electroforéticamente, se transfirieron a un filtro de nylon y se hibridizaron en Southern con la sonda

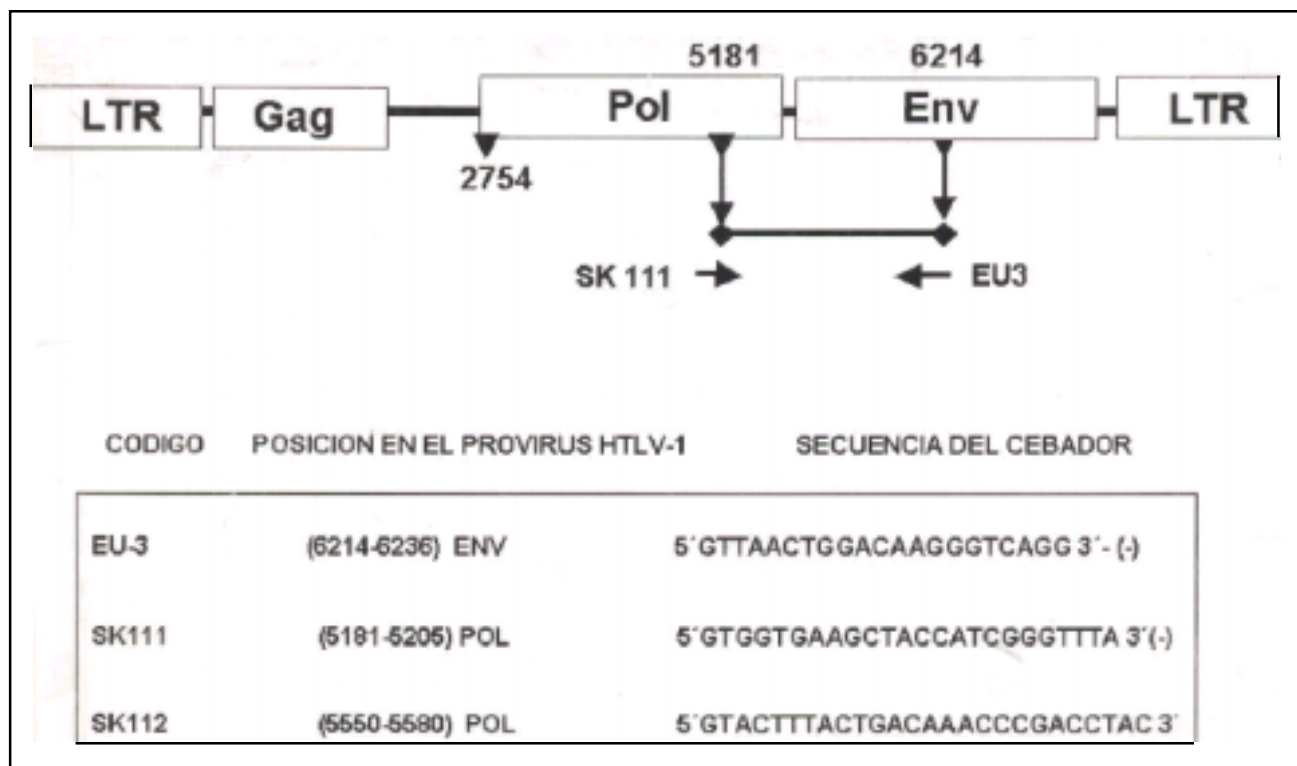


Figura 1. Localización dentro del genoma proviral del HTLV-I de la región de 1033 pb que incluyó porciones de los genes pol y env. En el cuadro adjunto se detallan las secuencias de los diferentes oligonucleótidos cebadores utilizados para efectuar las reacciones de PCR a partir del ADN proviral de muestras de linfocitos de sangre periférica de los individuos incluidos en este estudio.

SK-112 específica para HTLV-I que incluye secuencias complementarias al segmento amplificado correspondiente a los genes pol-env.

Los fragmentos de ADN producidos por las digestiones con las distintas endonucleasas de restricción antes descritas, se analizaron mediante la observación del patrón de bandas generadas en la hibridización por Southern y se compararon con la cepa MT-2. El análisis filogenético de los patrones de RFLP obtenidos se efectuó aplicando el programa PAUP versión 2 incluyendo secuencias del HTLV-I previamente publicadas. Las agrupaciones filogenéticas respectivas se realizaron con el método de los vecinos cercanos (NJ) mediante una prueba de *bootstrap* con 1,000 repeticiones. Para ello se usó el programa MEGA versión 1.2.

## RESULTADOS

La digestión del fragmento de 1033 bp generado por la amplificación del gen pol-env con las enzimas Hind III, BamH I y Pst I no reveló ninguna variación en el patrón de los aislados en relación con los obtenidos con las cepas MT-2 y ATK-1<sup>36</sup>. Sin embargo, se observaron patrones distintos cuando el ADN amplificado de las muestras se trató con las endonucleasas Pvu II y Dde I. El tratamiento con Pvu II permitió obtener un patrón de bandas que corresponden a un tamaño molecular de 572 y 460 pb para todas las muestras de ADN analizadas en este estudio y la cepa prototipo ATK-1. La cepa MT-2 y la muestra 0180 exhibieron un patrón de RFLP que correspondió a fragmentos con tamaños moleculares de 600, 353 y 187 pb.

El fragmento de 1033 pb amplificado de la cepa ATK-1 digerido con Dde I generó un patrón de bandas correspondiente a 489, 380 y 205 pb. La digestión del amplicón de la región pol-env efectuada con esta enzima en las muestras incluidas en este trabajo generó tres patrones distintos de restricción. En el patrón I se registraron amplicones de 900 y 125 pb para los aislados 120, 0198, 9HU, 105, 106, 107, 108, 109, 0130 y 152 además de la cepa ATK-1. En el patrón IIa se determinaron fragmentos de restricción de 700, 205 y 125 pb para los aislados 153, 157, 167, 101, 102, 103, 180, 189, 196, 202, 220, 233, 234, 272, 5HU. El patrón IIb rindió bandas de 550, 350 y 125 pb para las muestras 104, 3HU, tum 3027, tum 5720 y la cepa MT-2 (Figura 3).

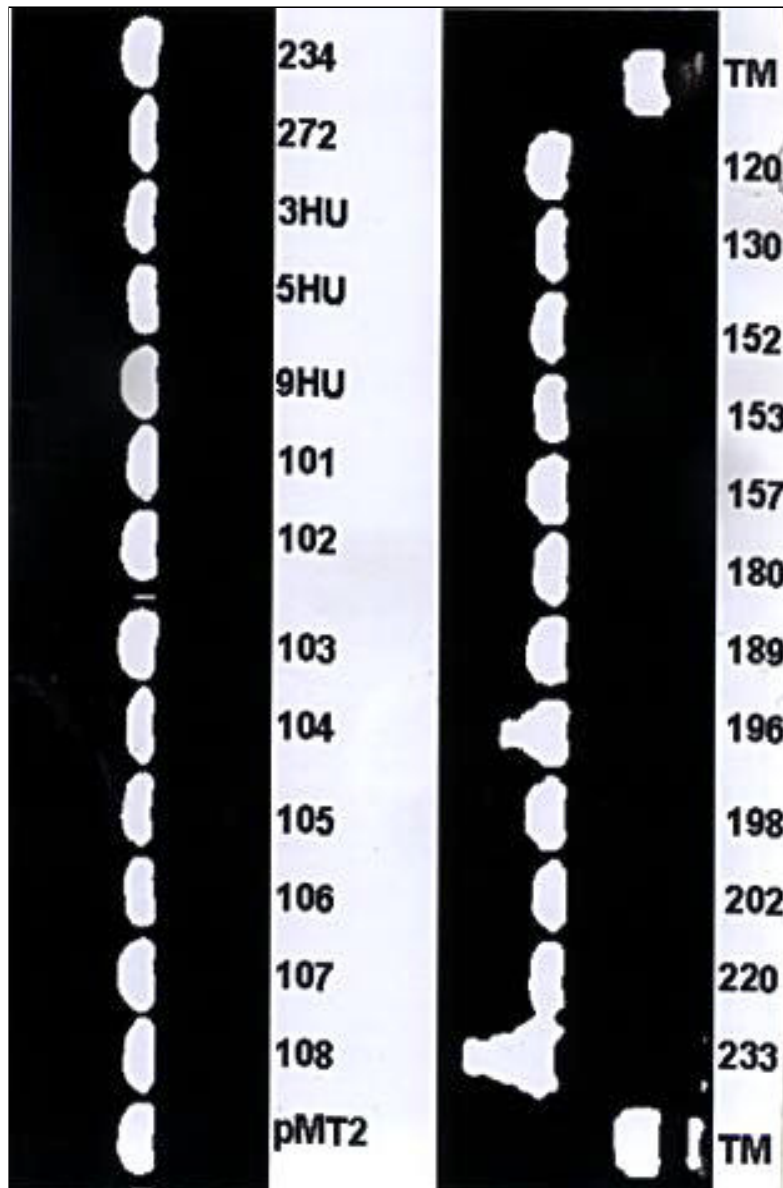


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del 1% del ADN del fragmento pol-env de 1033 bp obtenido mediante el proceso de PCR, de los ADN provirales de individuos seropositivos para el HTLV-I incluidos en este estudio. Los números en el borde superior de cada fotografía corresponden a los individuos estudiados. (15). Patrón de tamaño molecular correspondiente a una escalera de 1 Kb.

Al tomar como base los diversos patrones de restricción obtenidos por el tratamiento del fragmento pol-env con las endonucleasas de restricción Dde I y Pvu II se construyeron agrupaciones filogenéticas. El análisis efectuado en el árbol con base en el patrón de restric-

ción con la enzima Pvu II permitió determinar la existencia de un solo agregado viral que reveló una rama monofilética en la que se incluyeron todos los aislados virales con excepción de la muestra 0180 que formó una microagregación con la cepa MT-2

(Figura 4A). De otra parte, el dendograma construido a partir de los patrones de restricción de la enzima Dde I permitió definir dos ramas principales: la primera cuya distancia genética al punto de divergencia fue 0.075 incluyó los aislados 120, 198, 105, 106, 107, 109, 108, 109, 130, 152, 9HU y la cepa ATK-1. En la segunda rama, que es más compleja pues mostró dos submicroagregaciones, se calculó una distancia genética de 0.038 e incluyó el resto de los aislados además de la cepa MT-2. Fue importante observar la estrecha relación genética entre los aislados 3HU, 104, tum 3027 y tum 5720 procedentes de Tumaco (Figura 4B).

Cuando se correlacionó el patrón RFLP con Dde I de cada uno de los aislados con su origen geográfico, se observó que todos los incluidos en el patrón IIb provenían exclusivamente de personas del municipio de Tumaco (4/4). Esta restricción geográfica contrasta con la de los patrones I 88.9% (8/9) y IIa 73.3% (11/15) que se distribuyeron de preferencia en zonas del interior del suroccidente colombiano (Figura 5).

## DISCUSIÓN

En Colombia inicialmente se determinó la existencia del HTLV-I y de la PET/HAM en individuos de etnia negra de la costa colombiana del Océano Pacífico; sin embargo, cada día aumentan los informes de nuevas zonas endémicas y de otros grupos étnicos. En el presente trabajo no se observó preferencia entre el origen étnico y la variación genética observada en los agregados I y IIa; esto contrastó con lo observado en Tumaco en que 3 de las 4 muestras analizadas provenían de individuos negros, mientras que la otra correspondió a una persona mestiza.

En Colombia las áreas de mayor prevalencia de la infección por el virus

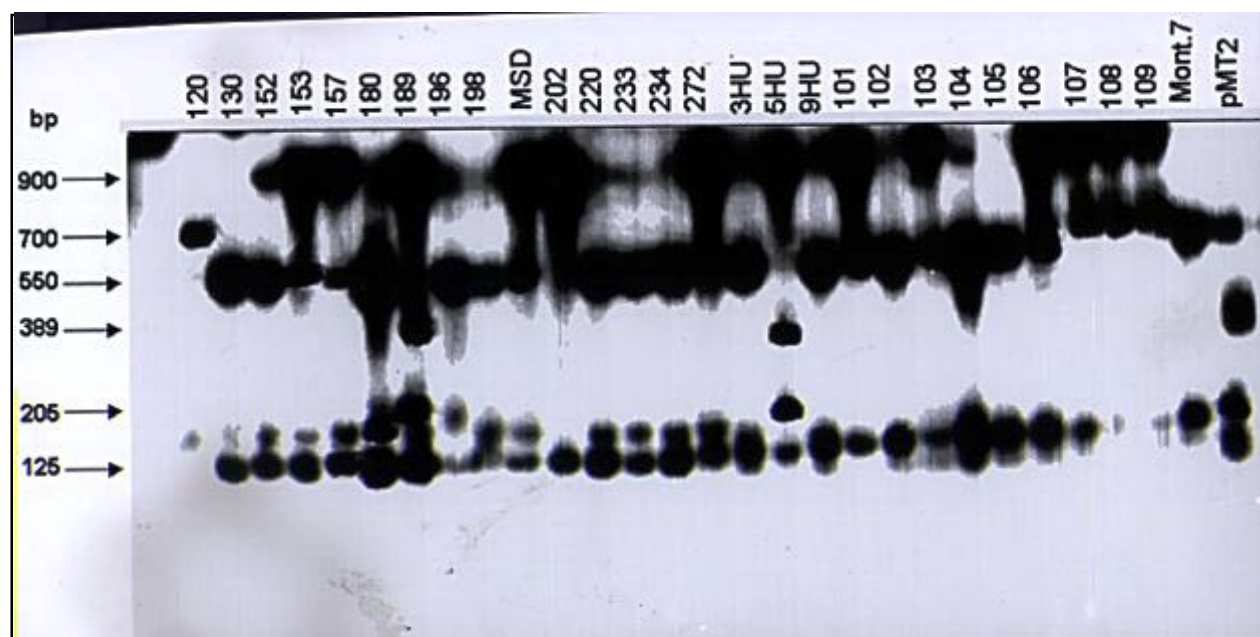


Figura 3. Patrón de hibridación en Southern, empleando la sonda SK-112, de fragmentos de restricción generados por el tratamiento con Dde I a partir del segmento de 1033 pb amplificado de la región pol-env de ADN proviral de los individuos seropositivos para el HTLV-I incluidos en este estudio. Los códigos consignados en el borde superior de la fotografía corresponden a las distintas muestras analizadas (MT2) cepa prototipo del HTLV-I utilizada como control para el estudio.

se concentran en el suroccidente colombiano. En esta región, los municipios de Tumaco, Guapi, Buenaventura, los alrededores de Cali y Puerto Tejada entre otros, registran prevalencias importantes. A pesar de la existencia de áreas endémicas para la infección por el HTLV-I en poblaciones no sólo de la costa del Pacífico sino del interior, se han efectuado en Tumaco la mayoría de los estudios<sup>19,32</sup> de la variación en las secuencias del gen env del HTLV-I. Éstos permitieron obtener pruebas de la existencia de una microheterogeneidad genética del virus en estos aislados geográficos.

En la presente investigación se analizaron genéticamente, mediante RFLP en la región pol-env, aislados del HTLV-I procedentes del suroccidente colombiano que incluyeron tanto la costa del Pacífico como áreas del interior de Colombia. En zonas endémicas para la infección por este retrovirus en su conjunto los resultados mostraron la

microheterogeneidad genética del HTLV-I. En este sentido la gran mayoría de los trabajos realizados con el fin de determinar las diferencias genéticas entre aislados virales, se ha hecho con secuenciación de ácidos nucleicos. Este procedimiento aunque es bastante sensible, es costoso y a la vez dispendioso. En contraste, el RFLP en combinación con la amplificación selectiva de fragmentos de ADN por PCR, es una buena alternativa experimental para abordar estudios de variación genética, porque es menos costosa, más rápida y permite analizar un mayor número de muestras en tiempos cortos. En este sentido, la determinación de sitios polimórficos para enzimas de restricción, permite explorar el genoma viral para encontrar mutaciones que generen patrones diferentes y se pueda analizar a nivel poblacional<sup>36-38</sup>.

Aunque el HTLV-I es genéticamente muy estable en comparación con el VIH 1 ó 2, no todos sus genes tienen tasas de

mutación equivalentes<sup>39</sup>. Este hecho es importante porque revela un proceso de mutación selectiva en ciertas regiones del genoma como un mecanismo de microevolución. Mediante análisis moleculares comparativos realizados en cepas virales del HTLV-I de varias áreas endémicas del mundo, se ha determinado un cierto grado de variabilidad nucleotídica que se registra principalmente en la región LTR y en los genes pol y env<sup>37,38</sup>. Los resultados en este sentido muestran que las variaciones nucleotídicas observadas se correlacionan con el origen geográfico viral. El presente trabajo confirma como mediante el rastreo de mutaciones puntuales que afectan un determinado sitio de restricción, que algunas de ellas, las provenientes del municipio de Tumaco, están restringidas geográficamente<sup>40</sup>.

En un intento por correlacionar la variación puntual registrada en la región pol-env mediante el análisis de RFLP

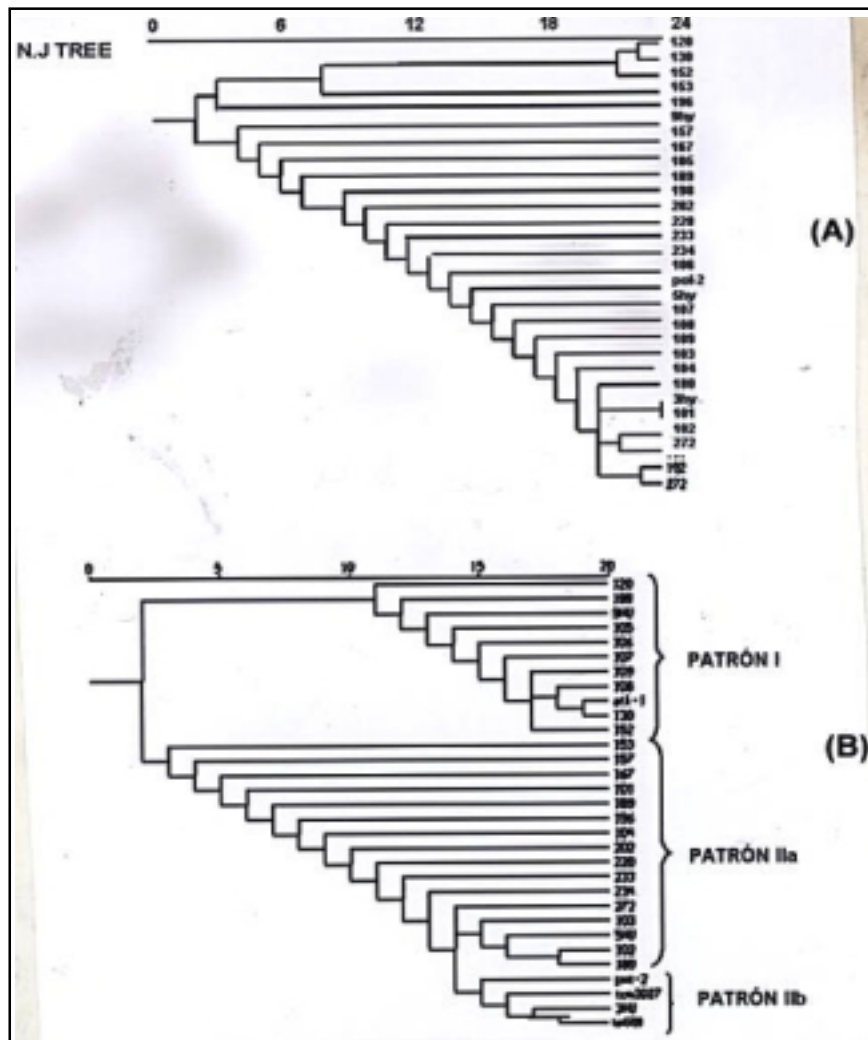


Figura 4. Agrupamiento filogenético, con el método de los vecinos más próximos (NJ) con un *bootstrap* de 1,000 repeticiones, de los patrones de restricción del fragmento pol-env de 1033 pb con las endonucleasas de restricción Pvu II y Dde I. (A) Agrupamiento correspondiente a la distribución filogenética de los patrones de Pvu II de los aislados incluidos en este estudio. (B) Agrupamiento correspondiente a la distribución filogenética de los patrones de Dde I de los aislados incluidos en este estudio. Se incluyeron como controles las cepas MT2 y ATK1.

con la de otras regiones del genoma proviral, se asociaron los distintos patrones de RFLP registrados para las endonucleasas Pvu II y Dde I con los obtenidos para la región LTR. El agrupamiento filogenético construido a partir del análisis de RFLP generado por la enzima Pvu II, permitió determinar la existencia de un solo tipo viral (el cosmopolita) estrechamente relacionado con las cepas japonesas. Sin embargo, en el árbol obtenido a partir del perfil de

restricción de la enzima Dde I se observaron dos ramas claramente definidas entre las cuales se distribuyó el subtipo transcontinental, mientras que el subtipo de África Occidental se agregó preferencialmente en los aislados de Tumaco y en la cepa MT-2, con excepción de las muestras 0106 y 0109.

En su conjunto, los anteriores resultados revelaron la existencia de microagregados que se originan por la presencia de variaciones leves en la

región pol-env en el ADN proviral de los aislados HTLV-I incluidos en este estudio; además, se constituyen en evidencia importante para definir las posibles rutas de introducción del virus a zonas del suroccidente de Colombia. Algunos estudios<sup>23,41,42</sup> postulan que la introducción del HTLV-I a Suramérica se produjo probablemente por varios caminos. Uno de ellos fue la trata de esclavos ocurrida durante los períodos de conquista y colonización del Nuevo Mundo; ésta muy posiblemente contribuyó a la introducción de cepas virales provenientes de África Occidental que se asentaron de preferencia en la costa colombiana del Océano Pacífico. Además de los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirmaría esta hipótesis el artículo publicado por Miura *et al.*<sup>42</sup>, que propone una introducción reciente (100 a 400 años) de cepas del HTLV-I provenientes de África.

Por otra parte, el análisis genético mediante RFLP de los aislados incluidos en el presente estudio provenientes de zonas endémicas del interior del suroccidente de Colombia, reveló la existencia de cepas cosmopolitas cuyo origen más probable pudo ser a partir de cepas japonesas. Este resultado es importante porque se convierte en una prueba que sustentaría que los aislados virales circulantes en zonas endémicas del interior del suroccidente de Colombia pudieron ser introducidos por las migraciones mongoloides ocurridas hace 30,000 años. El camino propuesto para la introducción al continente americano se efectuó a través del estrecho de Bering, y a partir de este sitio se dispersó por todo el continente incluyendo a Colombia<sup>43-48</sup>.

## SUMMARY

With the aim to explore the restriction fragment length polymorphism (RFLP) to Dde I restriction enzyme, the proviral region from 5181 to 6624 nts of HTLV-



Figura 5. Agrupación geográfica de los distintos patrones de RFLP con Dde I de los aislados del suroccidente colombiano incluidos en este trabajo.

■ Patrón I ▲ Patrón IIa ● Patrón IIb

I was amplified by PCR. The 1033 bp fragment containing the terminal 5' of gene pol and the surface domain of envelope gene (gp46) was amplified from PBMC proviral DNA of 29 HTLV-I seropositive individuals from several areas of southwest Colombia. The restriction analysis performed with Dde I revealed the circulation of three different Dde I RFLP patterns. Pattern I (900 and 125 bp) was observed in 34.5% (10/29) of isolates. Pattern IIa (700, 205 and 125 bp) was detected in

51.7% (15/29) of individuals. Finally, pattern IIb (550, 350 and 125 bp) included only 13.8% (4/29) of samples studied. Pattern IIb was exclusively detected in Tumaco in contrast with patterns I and IIa that exhibited a tendency to be distributed in the inland areas of southwest. Taken together results showed the existence of a divergent microevolutionary mechanism operating in endemic areas for HTLV-I infection of southwest Colombia.

Key words: HTLV-I. RFLP analysis. Genetic evolution. Microevolution. Geographic distribution.

## REFERENCIAS

- Bentrem DJ, McGovern EE, Hammarskjöld MI, Erdlich RF. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) retrovirus and human disease. *J Emerg Med* 1994; 21: 825-832.
- Gallo RC, Staal-Wong 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: 545-557.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsutski K, Uchina H. Adult T-cell leukemia clinical and hematology features of 16 cases. *Blood* 1977; 50: 481-492.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gaduzer AF, et al. Detection and isolation of type C retroviruses particles from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-7419.
- Zaninovic V, Biojón R, Barreto P. Paraparesia espástica del Pacífico. *Colombia Med* 1981; 12: 111-117.
- Osame M, Matsumoto M, Usuku K, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia like cells. *Ann Neurol* 1987; 21: 117-122.
- Jacobson S, Raine CS, Mingioli ES, McFarlin DE. Isolation of an HTLV-I like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis. *Nature* 1988; 331: 540-543.
- Mckhann G, Gibbs CJ, Mora CA, et al. Isolation and characterization of HTLV-I from symptomatic family members with tropical spastic paraparesis (HTLV-I/encephalomyeloneuropathy). *J Infect Dis* 1989; 160: 371-379.
- Rodger-Johnson PE. Tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. Etiology and clinical spectrum. *Mol Neurobiol* 1994; 8: 175-179.
- Takezaki T, Tajima K. Epidemiology of ATLL and HAM/TSP in Asia. In Zaninovic V (ed.). *HTLV Truths and Questions*. Cali: Fundación MAR/COLCIENCIAS, 1996. Pp. 66-77.
- Yamaguchi K. Human T lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet* 1994; 343: 213-222.
- Malik TA, Even J, Karpas A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T-cell leukemia virus/human T-cell leukemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of ATLV/HTLV subgroup. *J Gen Virol* 1988; 69: 1695-1710.
- Schulz TM, Calabro ML, Hoad JG, et al. HTLV-I envelope sequences from Brazil, the Caribbean and Romania: clustering of sequences according to geographic origin and variability in an antibody epitope. *Virology* 1991; 184: 483-

- 491.
14. Gessain A, Koralknik IJ, Fullen J, *et al.* Phylogenetic study of ten new HTLV-I strains from the Americas. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1994; *10*: 103-06.
  15. Ureta AV, Gessain A, Yoshida M, *et al.* Molecular epidemiology of HTLV-I in Japan: Evidence for two lineages with a particular geographical distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; *10*: 1557-1566.
  16. Dekaban GA, King EE, Waters D, Rice GPA. Nucleotide sequence analysis of a Chilean patient with HAM/TSP. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1992; *8*: 1201-1207.
  17. Ureta V, Gessain A, Yoshida M, *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*: 3655-3666.
  18. García-Vallejo F, Ramírez LS, Chou K, *et al.* Increased immunoglobulin levels in sera from patients with HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retrovirol* 1994; *10*: 507.
  19. García-Vallejo F, Renjifo B, Essex M. Nucleotide sequence variation in the envelope of patients with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *J AIDS Hum Retrovirol* 1995; *10*: 283.
  20. Dueñas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR, *et al.* Coexistence of human T-cell lymphotropic virus type I and II among Wayuu indians from the Guajira region of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; *8*: 185-195.
  21. Zaninovic' V, Sanzón Y, López F, *et al.* Geographic independence of HTLV-I and HTLV-II foci in the Andes highland, the Atlantic coast and the Orinoco of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; *10*: 97-101.
  22. Dangond F, Daza JS, Rosania A, *et al.* Tropical spastic paraparesis on the Caribbean coast of Colombia. *J Trop Med Hyg* 1995; *52*: 155-158.
  23. De-Thé G, Gessain A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) strains. Identification of a new and distinct HTLV-I molecular subtype in Central Africa in Pigmies. *J Virol* 1997; *71*: 1317-1333.
  24. Dumas M, Preux PM, Houinato D, Druet-Cabanac M. HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Africa. In Zaninovic' V (ed.). *HTLV Truths and Questions*. Cali. Fundación MAR/ COLCIENCIAS, 1996. Pp. 166-170.
  25. Román GC, Román LN, Spencer PS, *et al.* Tropical spastic paraparesis in Seychelles Island: a clinical and case control neuroepidemiologic study. *Neurology* 1987; *37*: 361-365.
  26. Nerurkar VR, Song KJ, Saitou N, *et al.* Interfamilial and intrafamilial genomic diversity and molecular phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type II from Papua New Guinea and the Solomon Island. *Virology* 1993; *196*: 506-513.
  27. Bastian I, Gardner J, Webb D, Gardner I. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *J Virol* 1993; *67*: 843-851.
  28. Wang CH, Yang CS. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I infection in Taiwan. *Cancer Res* 1988; *48*: 5042-5044.
  29. Nerurkar VR, Babu PG, Song KJ, *et al.* Sequence analysis of human T-cell lymphotropic virus type I strains from Southern India: gene amplification and direct sequencing from whole blood blotted onto filter paper. *J Gen Virol* 1993; *74*: 2799-2802.
  30. Lin MT, Chen PG, Yang YC, *et al.* Envelope gene sequences of human T-cell lymphotropic virus type I in Taiwan. *Arch Virol* 1990; *141*: 219-229.
  31. Malik TA, Even J, Karpas A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T-cell leukemia virus/human T-cell leukemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of ATLV/HTLV subgroup. *J Gen Virol* 1988; *69*: 1695-1710.
  32. Renjifo B, Osterman J, Borrero I, Essex M. Nucleotide sequence of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) from family cluster with tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy. *Res Virol* 1995; *146*: 93-99.
  33. Miura T, Yamashita M, Zaninovic' V, *et al.* Six human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) and eight human T-cell leukemia virus type II (HTLV-II) Cases newly isolated from the South American two Amerindian HTLV-I isolates. *J Evol* 1997; *44*: 76-82.
  34. Yamashita M, Ido E, Miura T, Hayami M. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world. *J AIDS Hum Retrovirol* 1996; *13* (Suppl 1): S124-S31.
  35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York; Ed. Cold Spring Harbor Press, 1989.
  36. Seiki M, Hattari S, Hirayama Y, *et al.* Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; *80*: 3618-3622.
  37. Komurian F, Pelloquin F, De Thé G. Geographic subtypes demonstrated by RFLPs following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1992; *8*: 429-434.
  38. Yang YC, Hsu TY, Liu MY, *et al.* Molecular subtyping of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) by a nested polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of the envelope gene: two distinct lineages of HTLV-I in Taiwan. *J Med Virol* 1997; *5*: 25-31.
  39. Liv H, Vandame AM, Kasad K, *et al.* Familial transmission and minimal sequence variability of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Zaire. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1994; *10*: 35-42.
  40. García-Vallejo F, Balcázar N. Inmunogenicidad diferencial de dominios de las glicoproteínas de la envoltura del HTLV-I. *Colombia Med* 1996; *27*: 101-105.
  41. Yanagihara R. Geographic-specific genotypes or topotypes of human T-cell lymphotropic virus type I as markers for early and recent migrations of human populations. *Adv Virus Res* 1994; *43*: 147-186.
  42. Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, *et al.* Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; *91*: 1124-1127.
  43. Zaninovic' V, Tajima K, Sonoda S, *et al.* Possible origins of HTLV-I in South America. In Proceedings of the Fifth International Conference on Human Retrovirology; HTLV. Japan, April 1992.
  44. Blank M, Blank A, King S, *et al.* Distribution of HLA and haplotypes of Colombian and Jamaican black populations. *Tissue Antigens* 1995; *45*: 111-116.
  45. Tajima K, Sonoda S, Hayami M. *Epidemic pattern of human T-cell leukemia virus among South America Mongoloid (Indigenous) people*. (Abstract). In The First World Conference on Prehistoric Mongoloid Dispersals, November 1992. Pp. 16-21.
  46. Liu HF, Goubau P, Brussel MV, *et al.* The three human T-cell lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. *J Gen Virol* 1997; *77*: 359-368.
  47. Arango C. Phylogenetics of HTLV-I. In Zaninovic' V (ed.). *HTLV Truths and Questions*. Cali; Fundación MAR/ COLCIENCIAS, 1996. Pp. 292-297.