

Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do vírus linfotrópico de células T humanas em sistema procarioto

Cloning and expression of the transmembranic glycoprotein from human T cell lymphotropic virus in a prokaryotic system

Elisa Maria de Sousa Russo-Carbolante¹, Flora Cristina Lobo Penteadó^{1,2},
Luciene Medeiros¹, Simone Kashima¹, Oswaldo M. Takayanagui³ e Dimas Tadeu Covas^{1,4}

RESUMO

O HTLV-1 é o vírus causador da leucemia/linfoma de célula T no adulto e de uma desordem neurológica conhecida por mielopatia associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical. Um dos modos de transmissão é pelo sangue contaminado e seus subprodutos e, devido ao risco de infecções associadas ao HTLV sua pesquisa na triagem de doadores de sangue foi introduzida no Brasil a partir de 1993. Os kits diagnósticos utilizados nos bancos de sangue nacionais são na sua maioria comprados de empresas estrangeiras. O Brasil não detém a tecnologia para produção deste material e há a necessidade de produção de sistemas de diagnóstico com tecnologia nacional. Neste trabalho, mostramos a expressão da gp21/HTLV-1 em Escherichia coli e sua reatividade frente a anticorpos monoclonais e de pacientes infectados. Expressar tais proteínas é o primeiro passo para obtenção de conjuntos diagnósticos com tecnologia brasileira.

Palavras-chaves: gp21. HTLV-1. Proteínas recombinantes. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

HTLV-1 is the virus that causes T cell lymphoma/leukemia in adults and a neurological disorder known as HTLV-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis. One of the transmission means is through contaminated blood and its byproducts. Because of the risk of HTLV-associated infections, screening for HTLV was introduced for Brazilian blood donors in 1993. Most of the diagnostic kits used in the national blood banks are bought from foreign companies. Brazil does not have the technology to produce this material and there is a need to produce diagnostic systems with national technology. In this study, we show the expression of gp21/HTLV-1 in Escherichia coli and its reactivity towards monoclonal antibodies and the antibodies of infected patients. Expressing these proteins is the first step towards obtaining diagnostic kits with Brazilian biotechnology.

Key-words: gp21. HTLV-1. Recombinant proteins. Heterologous expression.

O HTLV foi o primeiro retrovírus humano a ser descoberto^{15,22}. O HTLV-1 é o agente etiológico de, no mínimo, duas doenças diferentes: leucemia/linfoma de célula T no adulto²⁰ (ATL) e uma desordem neurológica conhecida por mielopatia¹³ associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical^{5,16} (HAM/TSP). O HTLV-1 é o único retrovírus conhecido como agente etiológico do câncer humano. O potencial patogênico do HTLV-2 é mais incerto, mas acumulam-se dados indicando sua associação a diversas patologias^{2,6,7,12,14,18,19,24}.

Estima-se que mais de 20 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam infectadas pelo HTLV^{4,23} e, de acordo com os diferentes relatos de prevalência publicados na literatura

específica, 850.000 a 2,5 milhões destas pessoas estão no Brasil¹¹, isso nos torna o país com o maior número de casos absolutos de HTLV.

De 20 a 60% das pessoas transfundidas com componentes sanguíneos celulares infectados por HTLV-1 ou 2 tornar-se-ão infectadas³ e entre estas de 2-5%, principalmente aqueles infectados pelo HTLV-1, desenvolverão ATL, HAM/TSP ou outra doença associada. Após a infecção se estabelece um estado perpétuo de carreador viral. O vírus fica presente como provírus incorporado no DNA cromossomal de linfócitos T.

O HTLV é classificado como um membro da família Retroviridae, da subfamília dos oncovírus. Este vírus tem um

1. Centro Regional de Hemoterapia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2. Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Júlio de Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 3. Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 4. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. Apoio financeiro: CNPq (processo 150420/2003-0), FAPESP e FINEP.

Endereço para correspondência: Dra. Elisa Maria de Sousa Russo-Carbolante. Centro Regional de Hemoterapia/HCFMRP/USP. R. Tenente Catão Roxo 2501, 14051-140 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Tel: 55 16 2101-9300; Fax: 55 16 2101-9309

e-mail: elisa@hemocentro.fmrp.usp.br

Recebido para publicação em 19/1/2007

Aceito em 26/4/2007

genoma retroviral complexo que codifica proteínas estruturais e enzimáticas sendo constituído por uma fita dupla de RNA com um comprimento de 8,5 a 9,0kb. O mapa genético do HTLV contém quatro regiões codificantes principais (*gag*, *pro*, *pol* e *env*) e também possui uma região na região 3' denominada pX que codifica duas proteínas regulatórias, Tax e Rex e outras proteínas adicionais cujas funções estão sendo investigadas⁸. O genoma do HTLV possui ainda, nos seus terminais 5' e 3', as regiões chamadas LTR (long terminal repeat) que contém o promotor e outros elementos reguladores. As proteínas estruturais são codificadas pelos genes *gag* e *env*. Os genes estruturais codificam poliproteínas que quando processadas geram as proteínas funcionais. A poliproteína do *gag* (p55) é clivada pela protease viral em proteínas da matriz (MA, p19), capsídeo (CA, p24) e nucleocapsídeo (NC, p15) e a poliproteína p61 do gene *env* dá origem a duas subunidades, a proteína de superfície (SU, gp46) e uma proteína transmembrana (TM, gp21).

Devido ao risco de infecções associadas aos HTLVs a triagem de doadores de sangue foi introduzida primeiramente no Japão em 1986, nos Estados Unidos e Canadá em 1988 e 1999 e na França em 1991. Outros países adotaram esta medida, inclusive o Brasil a partir de 1993¹⁰. Os primeiros testes introduzidos na metade dos anos oitenta usavam o lisado viral total do HTLV-1 como antígeno. Os ensaios evoluíram e peptídeos sintéticos ou recombinantes foram introduzidos¹. Além disso, antígenos específicos para o HTLV-2 foram incluídos, o que levou a um aumento da sensibilidade para detecção de amostras contaminadas por HTLV-2. As proteínas usadas como antígenos de captura nos testes diagnósticos mais modernos para detecção e diferenciação dos HTLV-1 e 2 são proteínas e peptídeos derivados dos genes *env* e *gag*.

Os kits diagnósticos utilizados nos bancos de sangue nacionais são na maioria comprados de empresas estrangeiras. O Brasil não detém esta tecnologia. Existe no país a necessidade de produção de sistemas mais avançados de diagnóstico com tecnologia nacional, que provavelmente, diminuirá o custo de tais produtos de maneira significativa. Para melhoria nos testes diagnósticos, principalmente os brasileiros, há a necessidade da inclusão de proteínas ou peptídeos recombinantes com seqüências imunogênicas capazes de detectar e discriminar anticorpos contra diferentes tipos de HTLV com alta eficiência, sensibilidade e exatidão. Expressar tais proteínas é o primeiro passo para obtenção de conjuntos diagnósticos com tecnologia brasileira confeccionados com emprego de biotecnologia.

Mostramos a produção da gp21/HTLV-1, uma das proteínas contidas nos kits diagnósticos para detecção de HTLV-1, e sua reatividade frente a anticorpos monoclonais e de pacientes infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de DNA. O material genético do vírus HTLV-1 foi obtido como DNA proviral a partir do sangue de candidatos a doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. O DNA proviral foi

extraído, a partir das células brancas separadas do sangue total anticoagulado, usando-se o *kit Super DNA straction quick gene* (Analytical Genetic, USA) segundo instruções do fabricante. A concentração do material foi determinada espectrofotometricamente a 260nm.

Desenho dos peptídeos iniciadores (*primers*).

Foram desenhados dois pares de primers para que a reação de amplificação fosse feita em duas reações seqüenciais. A seqüência de nucleotídeos utilizada para o desenho dos primers foi a do protótipo ATK-1, depositada no GenBank sob o número de acesso J02029, referente ao genoma completo do HTLV-1. O desenho dos *primers* foi feito de modo que os mesmos pudessem ser utilizados no Sistema GatewayTM, Invitrogen (São Paulo, Brasil) que emprega reações de recombinação baseada nas propriedades de recombinação sítio-específica do bacteriófago *lambda* para inserção do fragmento de DNA de interesse nos vetores.

Os *primers* desenhados contêm a seqüência correspondente do DNA do gene da proteína gp21, a seqüência relativa aos sítios de recombinação (*attb1* e *attb2*), a seqüência responsável pela ligação ao ribossomo (Shine-Dalgarno) e o fragmento Kozac.

Primer sense: - AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCCTGGCCATGGGAG
Primer anti-sense: AGAAAGC TGGGTCCAGGGATGACTCAGGTTT T
<i>attb1</i> : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3' (forward)
<i>attb2</i> : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT -3' (reverse)

Amplificação e purificação do fragmento de gp21 do gene *env* do HTLV-1.

Os fragmentos de DNA foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase catalisada pela *taq* polimerase¹⁷. A amplificação foi realizada em duas etapas; na primeira o material de partida foi o DNA genômico de indivíduos contaminados e os primers específicos para a seqüência do gene foram utilizados. O produto de PCR da primeira reação foi usado como material de partida para a segunda reação e os primers utilizados foram os *attb1* e 2. Nesta segunda etapa, os sítios de recombinação são adicionados. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato 0,04 mol/L, EDTA 0,001 mol/L pH 8,0 (TAE) e corado por brometo de etídio para visualização em transiluminador UV.

A totalidade do material obtido por PCR foi aplicada no gel de agarose *low-melting* 1% (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A banda de interesse foi recortada e o DNA purificado usando o kit Wizard PCR preps DNA purification System A 2180 (PROMEGA, CA, USA).

Clonagem. *Fragmento de gp21 em vetor plasmidial pCR®2.1TOPO®*: o fragmento codificante da gp21 foi clonado no vetor pCR®2.1TOPO® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) conforme as instruções do fabricante. Bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5α (Clontech, Heidelberg, Germany) competentes foram transformadas com o vetor recombinante por choque térmico. A cultura foi submetida à mini preparação de plasmídeo, realizada com a utilização do kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany), segundo as instruções do fabricante. A presença do fragmento de gp21 foi confirmada por PCR do DNA plasmidial.

Reações de recombinação do vetor TOPO/recombinante com o vetor pDonrTM221 (recombinação BP) e vetores de entrada (pEntry) com o vetor pDest15 (recombinação LR): o vetor TOPO recombinante foi linearizado e dosado para ser utilizado nas reações de recombinação BP. Na recombinação BP um segundo vetor recombinante é criado, chamado vetor de entrada (pEntry), este vetor possui o inserto e os cassetes de recombinação. Para esta reação foram utilizados 300ng do vetor pDonrTM221 e de 150 a 300ng do vetor TOPO recombinante. A reação foi realizada a 25°C/16h. O vetor obtido foi denominado pEntry/gp21/HTLV-1 e foi utilizado na transformação de bactérias DH5 α para selecionar os clones transformados. Os vetores do sistema GatewayTM carregam um gene tóxico que é retirado quando acontece a recombinação, deste modo, aquelas colônias que crescerem são provenientes de bactérias que carregam o vetor recombinado. Colônias transformadas foram submetidas à expansão clonal em meio LB-Kanamicina líquido, o DNA plasmidial foi extraído e quantificado para ser utilizado nas reações de recombinação LR.

Para a reação de recombinação, que leva à produção de um vetor de expressão, foram usados 300ng do vetor pDest15TM e de 100 a 300ng do vetor pEntry/gp21/HTLV-1. A reação aconteceu a 25°C/16h. Este vetor possui o gene da GST que é produzida em fusão com a proteína do gene inserido. Como anteriormente, a reação de recombinação foi usada para transformar bactérias DH5 α , foi feita a expansão clonal e extração dos plasmídios que foram utilizados para transformar bactérias de expressão. O vetor de expressão criado foi chamado de pDest15gp21/HTLV-1.

Bactérias de expressão BL21DE3pLysS ou RosetaDE3pLysS competentes foram transformadas por choque térmico com o vetor de expressão desenvolvido e plaqueadas em LB-ampicilina *overnight* a 37°C.

Expressão das proteínas recombinantes. Uma colônia carregando o vetor de expressão recombinante foi inoculada em meio LB líquido acrescido de ampicilina e incubada a 37°C sob agitação *overnight*. Um inóculo líquido foi preparado com 1% desse pré-inóculo e submetido a crescimento, nas mesmas condições anteriores, até atingir DO de 0,4 a 600nm. Uma alíquota deste inóculo foi retirada (tempo zero de indução) e ao restante da cultura foi adicionado IPTG (isopropil tiogalactosídeo) numa concentração de 1mM para que houvesse a indução da expressão protéica. Foram retiradas alíquotas da cultura em diferentes tempos de indução variando de 0 a 4 horas. As amostras coletadas foram centrifugadas a 500g por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise contendo NaH₂PO₄ 50mmol/L, pH 8,0; 1mg/mL de lisozima, MgCl₂ 10mmol/L, coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Inc, USA) e 20 μ L/amostra de Triton X100 a 1%. A mistura foi incubada em gelo por 20 minutos e submetida a 3 pulsos sônicos utilizando-se o *sonic demembrator 100* (Fisher Scientific, NJ, USA). As preparações foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000g, 4°C. O sobrenadante corresponde à fração de proteínas solúveis e o sedimento às insolúveis. A fração insolúvel foi ressuspensionada em tampão Tris-HCl 50mmol/L contendo 6mol/L de uréia, pH 8,0. As frações foram guardadas a -20°C para análises posteriores.

Avaliação da expressão. As frações de proteínas solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE a 12% segundo descrito por Laemmli⁹. Para cada um dos diferentes tempos de indução, foram gerados dois géis para analisar as frações solúveis e insolúveis separadamente.

A confirmação da expressão da proteína gp21/HTLV-1 foi feita por reação antígeno-anticorpo. Para isso, foi feita a transferência das frações protéicas separadas no gel de acrilamida para uma membrana de nitrocelulose usando-se o sistema de eletroforese mini-PROTEAN 3 system da Bio-Rad (BioRad Laboratories Inc, USA). A membrana gerada foi deixada em solução de bloqueio (albumina de soro bovino 2% (m/v), em tampão PBS) por 48 horas. Após o bloqueio a membrana foi incubada por 2h a temperatura ambiente para marcação com o anticorpo primário monoclonal anti-gp21 de HTLV-1, produzido em camundongo (NEN Life Science Products, Boston, USA), diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Decorrida a marcação, a membrana foi lavada e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Abcam, Inc, Cambridge, MA, USA) a temperatura ambiente, sob constante agitação. A membrana foi lavada com solução contendo Tris-HCl 0,1mol/L, NaCl 0,1mol/L e MgCl₂ 0,05mol/L e a revelação foi feita com NBT/BCIP.

RESULTADOS

O fragmento gênico correspondente à região codificante da gp21 foi amplificado por PCR, purificado, inserido no vetor de clonagem pCR@2.1TOPO® e submetido a reações de recombinação com os vetores do sistema GatewayTM. A presença do fragmento codificante da gp21 no vetor de recombinante foi confirmada por PCR e/ou seqüenciamento de nucleotídeos (dados não mostrados). A Figura 1 mostra o fragmento de DNA correspondente ao gene da gp21/HTLV-1 amplificado a partir de DNA genômico de indivíduo contaminado e a sua fração purificada.

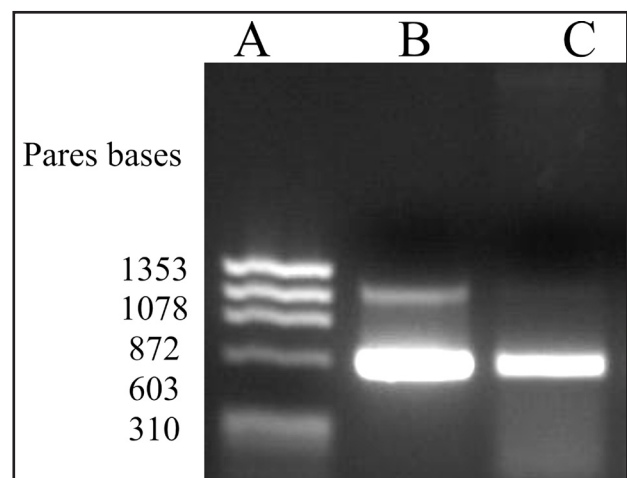


Figura 1 - Fragmento de DNA correspondente ao gene da gp21 do HTLV-1 (gel de agarose a 1% corado por brometo de etídio). A - marcador de peso molecular Φ x174; B - fragmento de gp21 do HTLV-1; C - fragmento de gp21 do HTLV-1 purificado.

Após amplificação e purificação do inserto, procederam-se as etapas de clonagem e recombinação. Em cada uma das etapas deste processo a inserção do fragmento foi verificada por PCR e observação em gel de agarose. A presença de um fragmento de cerca de 500pb indica a presença do fragmento codificante da gp21.

O vetor recombinante (pDest15gp21/HTLV-1) foi inserido em bactérias da linhagem BL21DE3pLysS ou RosetaDE3pLysS que foram induzidas à expressão. A análise da expressão por eletroforese em acrilamida revelou uma banda de proteínas de cerca de 45kDa que é o tamanho da gp21 mais o GST fusionado na fração de proteínas insolúveis, enquanto que, na fração de proteínas solúveis nenhuma evidência de expressão foi verificada (dados não mostrados). A Figura 2 mostra frações de proteínas insolúveis obtidas após indução da expressão protéica das culturas bacterianas.

Foram realizadas reações de *immunoblotting* para confirmar que a proteína recombinante produzida era de fato a gp21-HTLV-1. A Figura 3 mostra uma membrana evidenciando a presença de gp21/HTLV-1 na fração de proteínas insolúveis da cultura bacteriana.

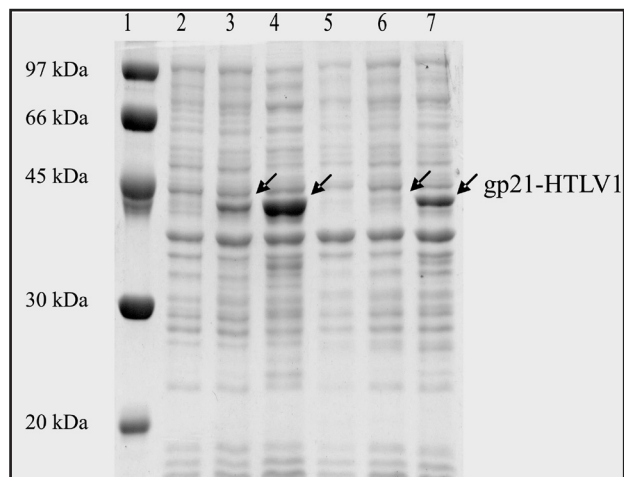


Figura 2 - Frações protéicas insolúveis após indução da expressão de bactérias recombinantes (gel de poliacrilamida a 12% corado por comassie blue). 1 - marcador de peso molecular de proteínas - LMW Amersham Biociences; 2-4 perfil da expressão de BL21DE3PlysS recombinante; 5-7 perfil da expressão RosetaDE3PlysS recombinante. 2 - indução de tempo 0; 3 - indução 30 minutos; 4 - indução 1h; 5 - tempo zero de indução; 6 - trinta minutos de indução; 7 - 1h de indução.

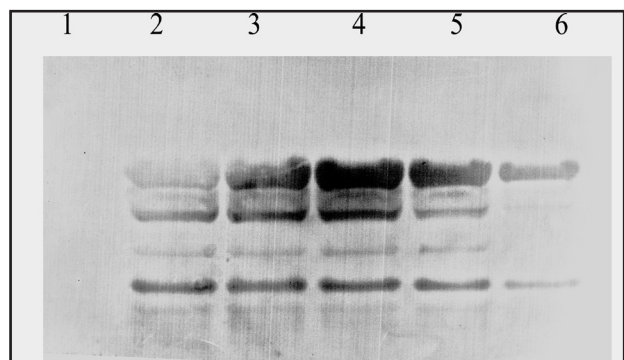


Figura 3 - Presença de gp21 do HTLV-1 em frações de proteínas insolúveis com diferentes tempos de indução (membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo primário monoclonal anti-gp21 HTLV-1 e revelada por NBT/BCIP). 1 - tempo de indução 0h; 2 - tempo de indução 30 minutos; 3 - tempo de indução 1h; 4 - tempo de indução 2 horas; 5 - tempo de indução 3 horas; 6 - tempo de indução 4 horas.

Para testarmos a capacidade de reconhecer anticorpos no soro de pacientes alguns testes foram feitos. Soros de paciente contaminados por HTLV-1 ou de indivíduos não contaminados foram colocados em contato com o a proteína recombinante gerada e a reação foi revelada. A Figura 4 mostra que a proteína recombinante desenvolvida é reconhecida pelos pacientes que são HTLV-1 positivos e não é reconhecida pelo soro de indivíduos não contaminados.

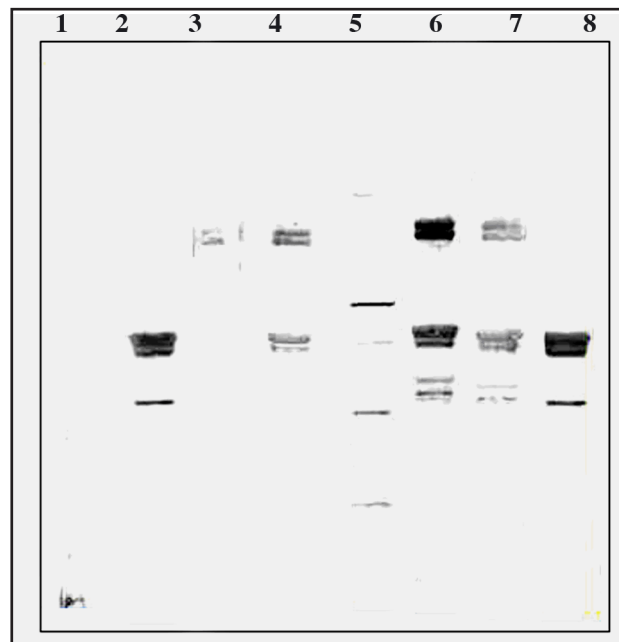


Figura 4 - Reconhecimento da proteína gp21do HTLV-1 por diferentes anticorpos (membrana de nitrocelulose marcada com variado anticorpos primários anti-gp21 HTLV-1 e revelada por NBT/BCIP). 1- pellet de bactérias BL21 DE3PlysS tempo zero de indução/AC 1º soro monoclonal; 2- pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC 1º soro monoclonal; 3- pellet de bactérias BL21 DE3PlysS tempo zero de indução/AC 1º soro de paciente HTLV-1 positivo diluído 400 vezes; 4 - pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC 1º soro de paciente HTLV positivo diluído 400 vezes; 5 - pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC 1º soro de indivíduo HTLV negativo diluído 200 vezes; 6 - pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC de paciente HTLV positivo diluído 200 vezes; 7 - pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC de paciente HTLV positivo diluído 600 vezes; 8 - pellet de bactérias BL21 DE3PlysS 1h de indução/AC 1º soro monoclonal.

DISCUSSÃO

A glicoproteína transmembrana é uma das proteínas mais imunogênicas do HTLV-1 e está presente nos conjuntos diagnósticos para detecção de HTLV-1 no soro²¹. Neste trabalho, o fragmento codificante da gp21 foi clonado num vetor de expressão que permitiu a expressão da proteína recombinante por duas linhagens de *E coli*: BL21DE3pLysS e RosetaDE3pLysS. A expressão da proteína recombinante pode ser vista a partir de 30 minutos de indução e as análises da expressão mostraram um alto nível de proteína.

Apesar de terem sido utilizados inibidores de proteases na preparação das amostras, a total inibição da degradação protéica não foi atingida. Isso pode ser evidenciado pelas bandas

marcadas reveladas abaixo daquelas da gp21. Os processos de purificação, em implantação, removerão a marcação das bandas de degradação.

As duas linhagens de bactérias utilizadas expressam eficientemente a proteína. Em ambas as linhagens a proteína gp21 do HTLV-1 está na fração insolúvel, nos corpos de inclusão, independentemente da presença de GST fusionada com a proteína recombinante e isso dificulta os processos de separação.

A proteína recombinante produzida no nosso laboratório pôde ser reconhecida pelos anticorpos de indivíduos HTLV-1 positivos até a diluição de 1:600 nos testes biológicos preliminares. Além disso, não obtivemos marcação inespecífica dos soros HTLV-1 negativos testados.

A produção de proteínas recombinantes é uma área em crescimento no nosso país. Desenvolver tais proteínas é o início de um processo que levará a produção de conjuntos diagnósticos nacionais com tecnologia competitiva com os estrangeiros. Relatamos a produção da proteína recombinante gp21/HTLV-1 que pode, eventualmente, ser empregada em testes diagnósticos tipo ELISA, Western Blot ou quimioluminescência.

REFERÊNCIAS

- Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, Krook A, von Sydow M, Dias F, Biberfeld G. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion* 39: 845-851, 1999.
- Carneiro-Proietti ABF, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Mello GEA, Martins-Filho AO, Pinheiro SR, Araujo AQ, Galvão-Castro B, Oliveira MS, Guedes AC, Proietti FA. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35: 499-508, 2002.
- Centers for Disease Control and Prevention and the USPHS Working Group. Guidelines for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) and type II (HTLV-II). *Annals of Internal Medicine* 118:448-454, 1993.
- Gessain A. Epidemiology of HTLV-I and associated diseases. In: Hollsberg P, Hafler DA (eds) *Human T-cell lymphotropic virus I* John Wiley and Sons, New York, NY, p. 34-64, 1996.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 407-410, 1985.
- Hall WW, Ishak R, Zhu SW, Novoa P, Eiraku N, Takahashi H, Ferreira MC, Azevedo V, Ishak MO, Ferreira OC, Monken C, Kurata T. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 13: S204-214, 1996.
- Harrington WJ, Sheremata W, Hjelle B, Dube DK, Bradshaw P, Fong SK, Snodgrass S, Toedter G, Cabral L, Poiesz B. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. *Annals of Neurology* 33: 411-414, 1993.
- Johnson JM, Harrod R and Franchini G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *International Journal of Experimental Pathology* 82: 135-147, 2001.
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doença Sexualmente Transmissíveis/AIDS. AIDS: Boletim Epidemiológico Ano VIII, nº 4, 1995.
- Monteiro-de-Castro MS, Assunção RM, Proietti FA. Spatial distribution of the Human T-Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) infection among blood donors of Hemominas Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1996. *Cadernos de Saúde Pública* 17: 1219-1230, 2001.
- Murphy EL, Glynn SA, Friley J, Sacher RA, Smith JW, Wright DJ, Newman B, Gibble JW, Ameti DI, Nass CC, Schreiber GB, Nemo GJ. Increased prevalence of infectious diseases and other adverse outcomes in human T lymphotropic virus types I- and II-infected blood donors. *Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) Study Group. The Journal of Infectious Diseases* 176: 1468-1475, 1997.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1: 1031-1032, 1986.
- Pinheiro SR, Lana MA, Proietti ABFC, Oréfice F, Martins MVCL, Proietti FA. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 53: 777-781, 1995.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 7415-7419, 1980.
- Rodgers-Johnson P, Gajdusek DC, Morgan OS, Zaninovic V, Sarin PS, Graham DS. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 1247-1249, 1985.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*: 239:487-91, 1988.
- Sheremata WA, Harrington Jr WJ, Bradshaw PA, Fong SK, Raffanti SP, Berger JR, Snodgrass S, Resnick L, Poiesz BJ. Association of (tropical) ataxic neuropathy' with HTLV-II. *Virus Research* 29: 71-77, 1993.
- Silva EA, Otsuki K, Leite AC, Alamy AH, Sá-Carvalho D, Vicente AC. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. *Journal of Medical Virology* 66: 253-257, 2002.
- Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Hattori T, Nishimura H, Tsuda H, Sanada I, Nakada K, Itai Y. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer Research* 45: 4644-4645s, 1985.
- Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusions Complications* 42: 780-791, 2002.
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Science* 79: 2031- 2035, 1982.
- Zaninovic V. HTLV-I associated diseases. In: Zaninovic V (ed) *HTLV. Truths and Questions*. Fundación MAR-Colciencias, Cali, p.301-313, 1996.
- Zehender G, De Maddalena C, Osio M, Cavalli B, Parravicini C, Moroni M, Galli M. High prevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection in patients affected by human immunodeficiency virus type 1 - associated predominantly sensory polyneuropathy. *Journal of Infectious Disease* 172: 1595-1598, 1995.