



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

BRUNO HIROYUKI OGAWA DA SILVA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS AO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE
CÉLULAS T HUMANAS 1(HTLV-1) POR *PHAGE DISPLAY***

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

BELÉM-PARÁ

2017

BRUNO HIROYUKI OGAWA DA SILVA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS AO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE
CÉLULAS T HUMANAS 1(HTLV-1) POR *PHAGE DISPLAY***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina, da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

BELÉM-PARÁ

2017

BRUNO HIROYUKI OGAWA DA SILVA

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS AO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE
CÉLULAS T HUMANAS 1(HTLV-1) POR *PHAGE DISPLAY***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina, da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado, ICB, UFPA.

Avaliador 1: Profa. Dra. Vânia Nakauth Azevedo

Avaliador 2: MSc. Leonardo Quintão Siravenha

Avaliador 3: Profa. Dra. Jacqueline Cortinhas Monteiro (Suplente)

BELÉM-PARÁ

2017

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Emilia e Jose, meus bens maiores, as pessoas que mais apostaram no meu potencial e sempre estão ao meu lado, me apoiando e me dando suporte para realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ser grato, é algo que sentimos por pessoas que de alguma forma se importaram, que mesmo no meio dessa correria da vida, abrem mão do próprio tempo em prol de outro. E nessa longa caminhada, recebi a ajuda de muitas pessoas, sem as quais, nada disso seria possível.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelas inúmeras bênçãos que me concede, todas as conquistas e de nunca me deixar desamparado.

A minha mãe Emilia Ogawa, a melhor mãe do mundo, que me tem como prioridade, antes dela mesmo. Sempre está do meu lado, me ajudando de todas as formas, não se importando com as dificuldades, ela é uma das minhas maiores motivações.

Ao meu pai, Jose, o pai que todo mundo sonha em ter, que me proporcionou estar onde estou, sempre me incentivou a seguir em frente, e por muitas vezes, soube me compreender como ninguém, ele é uma grande motivação para que eu continue. Infelizmente, meus pais não tiveram o filho perfeito, mas Deus me deu os pais perfeito.

A meu irmão, Tiago Ogawa, que me ajudou e me ajuda até hoje, fazendo seu melhor e me surpreendendo de forma positiva a cada dia. Por tempos carregou o peso do mundo nas costas sem dividir comigo, para que eu pudesse chegar onde estou.

A minha Bachan (avó), que sempre me deu os melhores conselhos, através da sabedoria que o tempo trouxe a ela. Sou muito feliz em tê-la como avó me guiando pelos caminhos da vida com sua vasta sabedoria e experiência.

A Aline Nakata, que acreditou no meu potencial mesmo quando nem eu mesmo acreditava, que sempre me incentivou a prosseguir, sempre esteve ao meu lado me apoiando e não me deixando desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. A pessoa que mais tem em comum comigo no mundo, que me compreende como ninguém.

Aos meus familiares, que sempre torceram pelo meu sucesso, que sempre me ajudaram com palavras que me motivavam e mesmo não estando perto, faziam-se presentes em minha vida de outras formas.

Aos meus amigos “Os Devassos”, parceiros de uma vida, com eles vivi grandes momentos de felicidade e pretendo construir muitas outras boas recordações ao lado dessas pessoas que me fazem sentir tão bem.

Aos amigos que a biomedicina me trouxe, onde pude conhecer pessoas incríveis. Emylly Caldas, dividimos muitos momentos de felicidade e dividimos o peso das dificuldades, nossa amizade estava destinada a acontecer, a melhor pessoa para fazer uma prova em dupla. Vivianne Araújo, minha parceira de estudos, que gosta de comer e de cinema tanto quanto eu e que me ajudou a amenizar as dificuldades dessa caminhada. Ismael Mendonça, o irmão que Deus me deu na graduação, foram muitos momentos de parceria, um ajudando o outro nos momentos de dificuldade, sem dúvidas, alguém com quem sempre vou poder contar. Pedro, Ísis e Natália, com quem divide momentos incríveis, só tenho a dizer que “Narnia” nunca será esquecida. Fabrício Lopes e Drika Uchoa, a minha grande parceria, amigos para uma vida inteira, momentos inesquecíveis não faltam para recordar e sei que ainda viveremos muita coisa juntos, são pessoas que quero levar para sempre em minha vida e sou muito grato a Deus por ter feito com que nosso caminhos se cruzassem.

Aos amigos do Laboratório de Virologia. Tive a sorte de participar dessa equipe, onde conheci pessoas que me passaram um pouco dos seus conhecimentos, que me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional. Vivi muitos momentos bons nesse laboratório, conheci pessoas incríveis com as quais compartilhei esses últimos anos que foram muito intensos, a todos do LabVir, o meu muito obrigado.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Machado, por ter me dado a oportunidade de participar de projetos de pesquisa nos quais adquiri muito conhecimento e pela orientação a qual foi muito valiosa para o meu desenvolvimento e através dela, pude crescer muito como profissional.

Ao Leonardo Siravenha e Larissa Freitas, pessoas as quais me espelho, espero um dia chegar a um nível intelectual e profissional igual ao deles, repartiram comigo um pouco do próprio conhecimento, sem eles, esse trabalho não seria possível.

Aos profissionais do Laboratório/Hospital Beneficente, onde pude conhecer pessoas incríveis nas quais me espelho e tenho como exemplo. Foi um período de muito aprendizado, onde cresci muito profissionalmente e como pessoa, graças aos excelentes profissionais que me orientaram, a todos, a minha eterna gratidão.

A Nami e Torá Ogawa, que mesmo no silêncio, me passam muito sentimento e me motivam a seguir em frente, tudo isso também é por vocês.

E finalmente, aos meus amigos que estão ao meu lado, que torcem pelo meu sucesso e me apoiam diretamente ou indiretamente, a todos, minha eterna gratidão.

Referencial Teórico

Os retrovírus foram descoberto nos anos 80, sendo considerados como os responsáveis por provocar o aparecimento de sarcoma em galinhas. Algum tempo depois foi atribuído aos retrovírus, o aparecimento de adenocarcinoma mamário e de leucemias em camundongos, dessa forma, aumentando o interesse da comunidade científica em relação à esse vírus.¹

Em 1970, foi descrita atividade de uma enzima que apresentava a capacidade de fazer a transcrição de uma fita de DNA a partir de um molde de RNA. Em decorrência dessa função, essa enzima recebeu a denominação de transcriptase reversa e a presença dessa enzima em todos os seres desse grupo de agentes virais, originou o nome da família viral que hoje é comunmente conhecida como *Retroviridae*.²

Em 1980, nos Estados Unidos, foi feita a primeira associação entre os retrovírus e neoplasias em seres humanos. Conseguiu-se isolar o primeiro retrovírus humano, o *Vírus linfotrópico de células T humana* (HTLV), a partir de uma linhagem de células linfoblastoides que foi obtida de um paciente com linfoma cutâneo de células nos Estados Unidos, e em seguida, detectar em soro de pacientes japoneses com quadros de Leucemia/Linfoma de células T de adultos.²

A família *Retroviridae* é dividida em duas subfamílias e sete gêneros, sendo essa divisão baseada nas propriedades morfológicas, biológicas e patogênicas dos vírus dessa família. Na subfamília *Orthoretrovirinae* são encontrados os gêneros *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* e *Lentivirus* e na subfamília *Spumaretrovirinae* é encontrado apenas um gênero chamado de *Spumavirus*.³

O Vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) é um vírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e do gênero *Deltaretrovirus*.³ O vírus possui tropismo por células T humanas; são morfologicamente esféricos, medindo entre 100 120 nm de diâmetro e contém duas moléculas de RNA de cadeia simples com polaridade positiva, o qual é circundado por um capsídeo que é composto por proteínas estruturais p19, p24 e p15, onde se encontram enzimas importantes no processo de replicação viral, como a protease, a transcriptase reversa e a integrase.^{4,5}

Externamente ao capsídeo encontra-se a o envelope viral, o qual foi adquirido da célula hospedeira, possuindo as glicoproteínas virais gp21 e gp46.⁶

Por muito tempo, o HTLV era comumente dividido em apenas duas espécies, o HTLV-1 e o HTLV-2 sendo que ambos possuem aproximadamente 70% de homologia nas sequências nucleotídicas. Hoje, sabe-se que existem mais duas espécies do vírus, que foram nomeados de HTLV-3 e HTLV-4, ambos encontrados pela primeira vez na África Central, porém, pouco sabe-se a respeito deles, a quantidade de estudos científicos ainda é reduzida.^{7,8}

A estratégia de replicação inicia com a interação da glicoproteína gp46 com o receptor GLUT-1 da superfície da célula alvo e a gp21 que tem como função a fusão do envelope viral com a membrana celular, logo ocorrendo a penetração do vírus na célula hospedeira.⁹ Em seguida ocorre a liberação do RNA viral que é transcrito em DNA pela ação da enzima transcriptase reversa, esse DNA, penetra o núcleo e através da enzima integrase, ocorre a integração desse DNA com o genoma celular, formando o DNA proviral.¹⁰

Integrado no genoma celular, o provírus torna-se estável e em seguida começa o processo de transcrição em RNA utilizando o sistema celular, onde a RNA polimerase II inicia a transcrição e desse processo há duas classes de produtos transcritos, um RNA genômico, sem evento de processamento do tipo *splicing* para incorporação do vírus maduro e dois RNAs subgenômicos, com um evento de processamento do tipo *splicing*, usados para gerar poliproteínas virais.^{11,12}

Em seguida, ocorre a última fase do ciclo replicativo, onde ocorre a montagem e o brotamento das novas partículas virais, sendo que o brotamento é resultante da interação da matriz a membrana celular, que é o processo pelo qual o vírus adquire o envelope.^{12,14}

Dos indivíduos infectados, apenas uma porcentagem de 3 a 4% desenvolvem doenças, sendo que o restante permanece assintomático por toda a vida.¹⁵ Indivíduos que venham apresentar sintomas ou algum sinal da infecção, geralmente, possuem um histórico de um longo período exposto ao vírus antes de apresentar manifestações clínicas. Quanto ao HTLV-2, ainda não foi esclarecido uma ligação com uma patologia neurológica ou sistêmica.^{16,17}

O HTLV-1 pode ser relacionado com várias doenças que apresentam diferenças quanto a forma clínica, evolução e terapêutica. Através de inúmeros estudos, hoje sabe-se que o vírus altera a resposta imune do organismo o qual infectou, a outras infecções de diversas naturezas, seja ela alterando a suscetibilidade a outras infecções ou alterando a evolução, já que o principal alvo do agente são os linfócitos TCD4⁺, que possui papel fundamental na resposta imune adaptativa.^{18, 19, 20, 21, 22, 23, 24}

Atualmente, várias doenças são associadas ao HTLV-1, como a uveíte, a ceratoconjuntivite seca, dermatite infecciosa, alterações psiquiátricas e psicológicas, doenças reumatológicas, porém, as que mais destacam-se são a Leucemia/Linfoma de células T do adulto e a Paraparesia espática tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH).^{25,26}

A Leucemia/Linfoma de células T do adulto é uma neoplasia de linfócitos maduros relacionada com a infecção pelo HTLV-1.²⁷ A forma clínica pode ser classificada em quatro subgrupos: aguda, crônica, linfomatosa e smoldering sendo que as formas mais agressivas são a aguda e a linfomatosa na qual o paciente apresenta sinais de síndrome tumoral que é caracterizada por linfadenomegalias, hipercalcemia, lesões de pele, lesões ósseas, lesões viscerais múltiplas ou infiltração pulmonar, hepatoesplenomegalia entre outros.^{2,28,29,30}

Dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, apenas 2 a 3% dos desenvolvem a PET/MAH, dentre os fatores de risco que influenciam a passagem de portador assintomático para sintomático pode-se destacar uma carga proviral elevada como o fator mais evidente, além de certos alelos de antígeno leucocitário humano (HLA) do hospedeiro que exercem função na modulação da resposta imunológica, funcionando como fator de proteção ou de suscetibilidade.^{31,32,33}

Pacientes com PET/MAH apresentam perda progressiva de capacidades motoras, como fraqueza dos membros inferiores, causando dificuldade na deambulação, incontinência dos esfínteres, distúrbios sensoriais, hiperreflexia, impotência sexual, lombalgia, entre outros sintomas e sinais que ocasionam o declínio da qualidade de vida do paciente.³⁴

Existem três hipóteses para explicar a neuropatogenia da PET/MAH. Na primeira hipótese, a teoria da toxicidade direta, as células gliais infectadas pelo HTLV-1 expressariam antígenos virais na sua superfície. Desta forma, linfócitos TCD8⁺ específicos contra o HTLV-1 cruzariam a barreira hematoencefálica e destruiriam as células gliais infectadas.^{35,36}

Na segunda hipótese, um antígeno próprio da célula glial seria confundido com algum antígeno viral. Os linfócitos TCD4⁺ presentes no sistema nervoso central confundiriam tal célula glial com um elemento estranho, por meio de uma reação autoimune que resultaria na morte celular, a chamada teoria da autoimunidade. Recentemente, foi identificada uma proteína neuronal (hnRNP-A1) que apresenta reação cruzada com a proteína viral Tax. Dessa forma, esse modelo de mimetismo molecular pode ter algum papel na patogênese da PET/MAH.^{37,38,39}

A última teoria, a do dano circunstante, diz que o linfócito TCD4⁺ infectado e o linfócito TCD8⁺ específico anti-Tax migrariam para o sistema nervoso central e interagiriam. Essa interação resultaria na liberação de citocinas, com consequente lesão glial.^{2,40,41}

Pacientes com PET/MAH normalmente apresentam progressiva perda das capacidades motoras, incluindo fraqueza dos membros inferiores, podendo causar dificuldade na locomoção, alguns distúrbios sensoriais, impotência sexual, lombalgia, entre outros sintomas e sinais.^{42, 19}

Descrita inicialmente por Smith em 1985, o termo *Phage Display* se refere à exposição de moléculas na superfície de bacteriófagos e a seleção destas com base na sua afinidade por uma molécula-alvo.⁴³

Foi estabelecido por Smith e colaboradores em 1985, um método de apresentação de polipeptídeos na superfície do bacteriófago filamentosos M13⁴⁴, o qual pertence à família *Inoviridae* e possui como material genético DNA fita simples (ssDNA). Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias Gram-negativas, sendo que a infecção ocorre via pilus sexual.⁴⁵

A metodologia de *Phage Display* consiste no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que a proteína ou o peptídeo expresso fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena.⁴⁶

Essa tecnologia é capaz de selecionar peptídeos ou proteínas que podem ser utilizadas para diversas finalidades. A técnica consiste em vários ciclos de seleção, lavagem, eluição e amplificação de fagos filamentosos que expressam sequências randômicas de peptídeos que ligam-se por afinidade a diversas moléculas. Bibliotecas comerciais de bacteriófagos randomizados podem ser utilizadas para a seleção de peptídeos recombinantes que mimetizam epítomos naturais. Estes clones, são submetidos a testes imunológicos para demonstrar sua reatividade contra o alvo de interesse.⁴⁶

A perfeita exposição de um peptídeo na superfície do bacteriófago possibilita a sua atuação como um ligante, uma enzima, um imunógeno ou desempenhando qualquer outra atividade em processos biológicos. A inserção de oligonucleotídeos degenerados e subsequente construção de bibliotecas de peptídeos tornam possível a seleção de proteínas com atividades ou afinidades específicas.^{47,48}

Referências

1. Gallo, R. C. (1986). The first human retrovirus. *Scientific American* 255, 88–98. Gasmi, M., Farouqi, B., d’Incan, M. & Desgranges, C. (1994). Long terminal repeat sequence

- analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 10, 1313–1315.
2. Brasil. Ministério da Saúde., Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV. 2013
 3. Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; et al. *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego; 2011
 4. Jones, K. S. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *Journal of virology*, 80: 8291– 302, 2006.
 5. Kroon, E.G. & Proietti, A.B.F.C. *Virus Linfotrópicos de Células T Humanas Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) – Histórico, Estrutura e Ciclo de Multiplicação Viral*. In: *Cadernos Hemomina HTLV*. Proietti, A.B.F.C et al., (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.11 – 20, 2006.
 6. Alcantara, L. C. J. et al. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 33, n. 4, p. 536-42, 2003.
 7. Champs, A. P. S. et al. HTLV-1 associated myelopathy: clinical and epidemiological profile in a 10-year case series study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 668–672. 2010.
 8. Andrade, R. G.; Robeiro, M. A.; Namen-Lopes, M. S. S.; et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43: 111–115. 2010.
 9. Manel, N.; KIM, F. J.; Kinet, S.; Taylor, N.; Sitbon, M. & BAttini, J. L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115: 449, 2003
 10. Coffin, J. M. *Retroviridae*. In: *Fundamental Retrovirology*. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L. Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.) Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. p.763 – 843.
 11. Lairmore, M. D., Raynes, R. & Anupan, R. Mechanisms of human Tlymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current Opinion in Virology*, 2: 474-81, 2012.
 12. Tillmann, M., Wessner, R. & Wigdahl, B. Identification of human T-cell lymphotropic virus type I 21-base-pair repeat-specific and glial cell-specific DNAprotein complexes. *Journal of Virology*, 68: 4597–4608, 1994.
 13. Derse, D., Hill, S.A., Lloyd, P.A., Chung, H., Morse, B.A., 2001. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J. Virol.* 75 (18), 8461–8468.
 14. Cullen, B.R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiological Reviews*, 56: 375–394, 1992
 15. Kannagi M, Takashi O, Harashima N, Hanabuchi S, Hasegawa A. Immunological risks of adult T cell leukemia at primary HTLV-I infection. *Trends in Microbiology* 2004; 12(7):346-352.
 16. Romanelli LCF. et al. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I): Quando suspeitar da infecção? *Revista da Associação Médica Brasileira*. 56(3): 340-347, 2010.

17. Gessain A, Mahieux R, de The G 1996. Genetic variability and molecular epidemiology of human and simian T cell leukemia/lymphoma virus type I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1:S132-45.
18. Amano, M.; Setoyma, M.; Grant, A. & Kerdel, F. Human Tlymphotropic virus 1 (HTLV-1) infection--dermatological implications. *International journal of dermatology*, 50: 915–920. 2011
19. Shimazaki, R. et al. Chronic sensory neuronopathy associated with human Tcell lymphotropic virus type I infection. *Journal of the neurological sciences*, 194: 55–8, 2002.
20. Alves, C. & Dourado, L. Endocrine and metabolic disorders in HTLV-1 infected patients. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*,14: 613–620. 2010.
21. Eguchi, K. et al. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 51: 769– 776. 1992b.
22. Carvalho, M. M. N. DE et al. Frequency of Rheumatic Diseases in Individuals Infected with HTLV-1. *Rev Bras Reumatol*, 46: 315–322. 2006
23. Nakanura, H. et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56: 167– 172, 1997.
24. Shirdel, A. et al. Is there any Association Between Human Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Infection and Systemic Lupus Erythematosus? An Original Research and Literature Review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16: 252–7, 2013.
25. Castro-Costa, C. M. DE et al. Pain in tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy patients. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 67: 866–870. 2009.
26. Cruz, B. A.; Catalan-Soares, B.; ProiettiI, F. Rheumatic Manifestations associated with the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I). *Rev. Bras. Reumatol*, 45: 71–77. 2005.
27. Barbosa HS, Bittencourt AL, Barreto de Araújo I, Pereira Filho CS, Furlan R, Pedrosa C, Lessa G, Harrington W Jr, Galvão Castro B. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999 May 1;21(1):65-71
28. Setoguchi Y, Takahshi S, Nukiwa T, Kira S. Detection of human T-cell lymphotropic virus type interstitial pnemonia. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1361-5. Shimoyama,1991.
29. Poiesz BJ, Poiesz MJ, Choi D. The human T-cell lymphoma/leukemia viruses. *Cancer Investigation* 2003; 21(2):253-77.
30. Veronesi R, Foccacia R. *Retrovíroses Humanas: Doenças associadas ao HTLV: Etiologia, Patogenia, Patologia Clínica, Tratamento, Prevenção*. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.
31. Vallinoto, A. C. R. et al. FAS-670A/G single nucleotide polymorphism may be associated with human T lymphotropic virus-1 infection and clinical evolution to TSP/HAM. *Virus research*, 163: 178–82, 2012
32. Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Soares BCC, Martins ML, Melo GEAB, Martins-Filho AO, Pinheiro SL, Araújo AQC, Galvão-Castro B, Oliveira MSP, Guedes AC, Proietti FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002b; 35(5):499-508

33. Barmark K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology* 2003; 308:1-12.
34. Puccioni-Sohler M, Chimelli L, Merçon M, Gonçalves RR, Pimente G, Bianco C, Rios M, Jacobson S. Pathological and virological assessment of acute HTLV-I-associated myelopathy complicated with encephalopathy and systemic inflammation. *Journal of Neurological Sciences* 2003; 207:87-93.
35. Furukawa, Y. et al. Different cytokines production in tax-expressing cells between patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-1 carriers. *Journal Infectious Diseases*, v. 187, p. 1116-1125, 2003.
36. Ijichi S. et al. HAM/TSP: recent perspectives in Japan. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, v. 13, p. 26-32, 1996.
37. Moskey, A. J.; Asquito, B.; Bangham, C. R. Cell-mediated immune response to HTLV-1. *Viral Immunology*, v. 18, p. 293-305, 2005.
38. Furuya, T. et al. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy associated with multi-organ inflammatory disease: a case report. *Journal of the Neurological Science*, v. 157, p. 109-112, 1998.
39. Lee, S. M. et al. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. *Current Topical Microbiology and Immunology*, v. 296, p. 125-136. 2005.
40. Sakai, J. A. et al. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T-cells. *Blood*, v. 98, p. 1506-1511, 2001.
41. Araújo, A.; Silva, M. T. T. Neurologic manifestations of HTLV-1 infection. In: Roos KL. (ed). *Principles of Neurologic Infectious Diseases*, McGraw-Hill, New York, p. 137-149, 2005.
42. Assone, T.; Souza, F. V.; Gaester, K. O.; Fonseca, L. A. M.; Luiz, O. C.; Malta, F.; et al. IL-28B gene polymorphism SNP rs8099917 genotype GG is associated with HTLV-1-associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 carriers. *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e3199, 2014.
43. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*. v.19, n.1, p.1-33, 2001.
44. Sergeeva, A. et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced drug delivery reviews*, Amsterdam, v.58, n°15, p.1622-1654, abril, 2006.
45. Brigido, M.M.; Maranhão, A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, São Paulo, no26, p.44-51, maio/junho, 2002.
46. Barbas III, C.F.; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. *Phage Display – A Laboratory Manual*, vols. I, II. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, 2001.
47. Willats, W. G. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol*. Dordrecht. v. 50. n. 6. p. 837-54. Dez. 2002.

48. Strauss, S. K; SCOOT, W. R. P; SYMMOUNS, M. F; MARVIN, D. A, On the structures of filamentous bacteriophage Ff (fd, f1, M13), Eur Biophys J, v. 37, p-521-527, 2007.

Seleção de peptídeos miméticos ao Vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) por *Phage Display*

Identification of mimetic peptides to the *human T-cell lymphotropic virus 1* (HTLV-1) by *Phage Display*

Bruno Hiroyuki Ogawa da Silva

Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brasil

Luiz Fernando Almeida Machado

Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém,
Pará, Brasil

Resumo

Segundo o algoritmo do Ministério da Saúde, o diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus, sendo que para a confirmação e a discriminação entre HTLV-1 e HTLV-2 são utilizados testes moleculares, tornando o diagnóstico de custo elevado. O presente estudo teve como objetivo utilizar a técnica de *Phage Display* para identificar novos peptídeos miméticos ao HTLV que possam ser usados em futuras plataformas de diagnóstico. Foram utilizadas 7 amostras de plasma de indivíduos portadores da infecção pelo HTLV-1 e 10 amostras de indivíduos da população geral de Belém, Pará, Brasil, com sorologia negativa para HTVL-1. Foi feito o acoplamento aos anticorpos nas microesferas magnéticas proteína G, seleção de peptídeos recombinantes através de *biopanning* e uma análise de reatividade dos fagos selecionados através de *Phage-ELISA*. Foram identificados 46 clones de fagos, contendo peptídeos de 12 aminoácidos, que mostraram razão de densidade ótica, nos testes de ELISA, entre os soros positivos e negativos, maior que 2, o que demonstra potencial de ser peptídeos miméticos ao vírus estudado.

Palavra-chave: *Vírus linfotrópico de células T humanas 1; Phage Display, Diagnóstico*

1. Introdução

O Vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) foi descrito pela primeira vez em 1980, encontrado em células T de pacientes com linfoma cutâneo.¹ A transmissão do vírus ocorre pela via sexual, parenteral e vertical, sendo que esta última forma, representa uma grande preocupação para o Ministério da Saúde, uma vez que o aleitamento materno é uma das principais formas de transmissão do vírus.² Desta forma, a detecção da infecção pelo HTLV de forma rápida e eficaz é de grande importância em exames pré-natal.

Na maioria dos casos, a infecção assintomática pelo HTLV é descoberta quando o indivíduo é um candidato a ser doador de sangue, mas apesar dos hemocentros realizarem a sorologia para a detecção de anticorpos anti-HTLV, a confirmação através de um teste com especificidade para a infecção não é levada a diante, a qual será necessário ser realizada em outro laboratório.³

Segundo o algoritmo do Ministério da Saúde, o diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus, sendo realizado em duas etapas, a triagem e a confirmação. Em certos casos, a confirmação e a

discriminação entre HTLV-1 e HTLV-2 não são possíveis através do teste confirmatório, logo se utiliza testes moleculares.⁴

As amostras de soro são triadas para anticorpos anti-HTLV-1 usando testes imunoenzimáticos autorizados, de fabricantes diferentes, preparados com antígenos do HTLV-1 a partir do lisado total do vírus e algumas proteínas recombinantes. Estes ensaios variam na sensibilidade para detectar anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2.⁵

Testes adicionais, como o Western blot (Wb) e a análise por radioimunoprecipitação, são necessários para interpretar, com correção, os espécimes repetidamente reagentes, o que torna o diagnóstico oneroso, lento, além de necessitar de infraestrutura e pessoas especializadas para realizá-lo.

Os testes adicionais devem ser capazes de identificar anticorpos para proteínas do core (gag) e do envelope (env) do HTLV-1/2. Portanto, além de os testes sorológicos serem importados, eles ainda não possuem a devida sensibilidade requeridas para a detecção, principalmente, do HTLV-2c que é disseminado entre populações indígenas da região amazônica, com a ocorrência de resultados falso-negativos, como foi demonstrado por Ishak et al. (2007)⁶. Desta forma, faz-se necessária a produção de novos alvos para o aprimoramento dos testes sorológicos.

A reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) está sendo utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas, porém não é uma técnica disseminada entre os laboratórios de rotina clínica. Estratégias direcionadas para a investigação de novos epítomos do HTLV1/2 são de grande importância para o aperfeiçoamento das plataformas de diagnóstico sorológico da infecção por esses agentes, uma vez que inúmeros kits comerciais não são preparados com agentes circulantes em nosso país e menos ainda na região Amazônica, tal como foi demonstrado por Ishak et al. (2007)⁶.

A técnica de *Phage Display* foi utilizada com o objetivo de expor biomoléculas em fagos. Com essa técnica é possível isolar e selecionar vetores que são gerados a partir de bibliotecas genômicas por meio de fagos infecciosos, dessa forma é possível o rastreamento dos clones devido a ligação com o peptídeo de interesse com o vetor de clonagem que o expressou.^{7,8}

Novos peptídeos, miméticos, naturais ou quiméricos, também poderão ser utilizados para o desenvolvimento de vacinas contendo múltiplos epítomos que induzem anticorpos neutralizantes, que poderão ser eficazes não somente na prevenção destas infecções virais, mas também poderão ser utilizados no desenvolvimento de plataformas nanobiotecnológicas para o diagnóstico mais rápido, preciso e de baixo custo.^{9,10}

O método de *Phage Display* utiliza bibliotecas aleatórias de peptídeos expressos em fagos filamentosos, os quais são capazes de mimetizar epítomos lineares e conformacionais de domínios protéicos e mesmo estruturas de carboidrato.¹¹ Com o uso desta técnica, epítomos lineares e conformacionais previamente desconhecidos que apresentam alta afinidade com anticorpos mono e policlonais tem sido identificados com sucesso.^{12,13}

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo geral a seleção de peptídeos miméticos a proteínas do HTLV-1 imunorreativos contra IgG de pacientes infectados, por meio da metodologia de *Phage Display*, os quais poderão ser potencialmente utilizados no desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas da infecção por este vírus.

2. Material e métodos

No presente estudo, foram utilizadas amostras de plasma, previamente colhidas e armazenadas no Laboratório de Virologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, sendo que o número de indivíduos de cada segmento populacional foi assim distribuído:

- i) 7 Indivíduos portadores da infecção pelo HTLV-1;
- ii) 10 indivíduos da população geral de Belém, Pará, Brasil com sorologia negativa para HTVL-1.

As amostras de sangue (10 mL) foram colhidas em um sistema de colheita a vácuo, em dois tubos de 5 mL, contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Virologia do ICB da UFPA, onde o plasma foi separado por centrifugação a 8.000 rotações por minuto(rpm), durante 15 minutos e, juntamente com a fração celular, congelado à -80°C até o momento de uso.

CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

i) Indivíduos portadores do HTLV. Os indivíduos portadores do HTLV são provenientes do Ambulatório de Infectologia do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará, que apresentaram sorologia positiva para a presença de anticorpos anti-HTLV-1, após análise clínica para avaliar sinais e sintomas neurológicos para presença da Mielopatia Associada ao HTLV e doenças associadas. Em todos os indivíduos também foi realizada sorologia para a detecção de anticorpos anti-HIV (HIV-1/2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho Diagnostic Systems Inc., USA), anti-HBV, anti-HCV, anti-T. pallidum e anti-T. cruzi. A confirmação da infecção pelo HTLV-1/2 foi realizada por meio da técnica de Nested-PCR e/ou PCR em tempo real.

ii) Indivíduos controles com sorologia negativa para HTLV que eram candidatos a ser doadores de sangue na Fundação HEMOPA

METODOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY*

Acoplamento das IgG nas microesferas magnéticas proteína G

A purificação de IgG a partir do soro de pacientes portadores do HTLV-1, assim como do controle negativo, foi feita por meio de microesferas magnéticas (*beads* magnéticos) conjugadas a proteína G (Dynabeads- Invitrogen) como plataforma. Cada 2×10^9 partículas de *beads* (100 uL do estoque), foram lavadas três vezes com tampão MES (0,1 M pH=5.0) para ativação das microesferas, foram adicionados 300uL de *pool* de plasma de pacientes portadores do HTLV-1, assim como do controle negativo, seguida da incubação por 30 minutos sob agitação a 37°C.

As microesferas adsorvidas com anticorpos foram, então, lavadas novamente três vezes com 1ml de tampão PBS-T(0,05%) com a finalidade de retirar os anticorpos não ligantes. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e as *beads* foram eluídas com 200uL de PBS-T(0,05%)

Seleção dos Peptídeos Recombinantes

Biopanning (Seleção de bacteriófagos) – Em solução:

Foram utilizados 10 μ L (1x10¹¹ partículas virais) de cada biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.12 da NEW ENGLAND BioLabs®Inc.), diluída em 190 μ L de PBS(0,1%) para a seleção de ligantes de IgG de pacientes portadores do HTLV.

As bibliotecas são compostas por 7 e 12 aminoácidos randômicos expresso na região da pIII do bacteriófago, sendo na biblioteca de 7 aminoácidos flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto.

A seleção foi realizada com 20 μ L das microesferas de proteína G acopladas com IgGs. Para a seleção negativa, a biblioteca de *Phage Display* foi incubada, por 30 minutos sobre agitação a 37°C, com as microesferas acopladas com IgG de controles negativos para o HTLV, e em seguida, as microesferas foram precipitadas com a utilização de um aparato magnético e o sobrenadante foi transferido a outro tubo contendo microesferas acopladas com IgG do grupo de controle negativo para HTLV. Este procedimento foi realizado por 3 vezes com grupo controle negativo e 3 vezes com grupo de controle positivos.

Para a seleção positiva, o sobrenadante de fagos, previamente incubado com IgGs do pool de controle negativo para HTLV, foi transferido para um tubo contendo microesferas acopladas com IgG de pacientes portadores do HTLV, esse processo foi repetido três vezes.

Ao final do processo, as microesferas contendo o sistema beads-anticorpo anti-HTLV-1, mais os fagos foram lavadas 10 vezes com PBS-T 0,05%, e os fagos selecionados foram eluídos com 500 μ L de glicina pH 2.0 e foram deixado em agitação por 15 minutos por inversão. Em seguida, foi feita a neutralização com 75 μ L de Tris pH 9.0, em seguida, o tubo foi colocado em uma *hack* magnética e reservado o sobrenadante sendo que 15 μ L foram reservados para realizar a titulação. Após a seleção, a amplificação dos fagos foi feita pela inoculação de um meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio será incubado sob agitação à 37°C até a fase early-log (OD 600 ~ 0,3).

Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500 μ L dos eluatos dos fagos e incubados à 37°C por 4 a 5 horas sob forte agitação. Em seguida, a cultura foi centrifugada à 4°C à 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante.

A solução foi incubada por 12-16 horas à 4°C para a precipitação dos fagos e posteriormente, centrifugada à 10.000 rpm por 15 minutos à 4°C e descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1 mL de PBS 1x e reprecipitado com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por uma hora no gelo e centrifugado à 14000rpm por 10 minutos à 4°C, sendo que o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspenso em 200 μ L de PBS1x, obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado à 4°C.

Pré-Screening - *Phage*-ELISA:

Para analisar a reatividade dos clones selecionados às IgG dos pacientes portadores do HTLV-1 e indivíduos controle negativos, será realizado o ensaio de ELISA.

As placas de microtitulação carregadas (NUNC, Maxisorp) foram sensibilizadas com 1µg/poço de anticorpo monoclonal anti-M13 (GE Healthcare), sem marcação, diluído em tampão carbonato 50 mM pH 9.6 por 16 horas à 4°C. Decorrido o tempo de sensibilização, as placas foram lavadas uma vez com 300µL de PBS1x e bloqueadas com tampão de bloqueio (300µL de PBS1x suplementado com 5% de leite desnatado) por 1 hora à 37°C.

As placas foram lavadas duas vezes com PBS1x e incubadas com 50µL/poço de cultura dos fagos selecionado para de HTLV e de cultura de fago de *Chlamydia Trachomatis* para controle negativo das reações, por 1 hora à 37°C.

Posteriormente, as placas foram lavadas seis vezes com 300µL de PBS-T 0,05% e os clones miméticos a proteínas do HTLV-1 foram incubadas por 1 hora à 37°C com 50µL do pool de soro de pacientes portadores do respectivo vírus diluído em PBS1x-Molico e o pool de controle negativo também com PBS1x-Molico. Após este período, as placas foram lavadas seis vezes com 300µL de PBS-T 0,05% e incubadas com 50µL de anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS1x suplementado com 5% de leite desnatado molico, durante 1 hora à 37°C.

Após seis lavagens com PBS-T 0,05%, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg/mL acrescida de 3% de água oxigenada (H₂O₂). A reação foi interrompida pela adição de 20uL de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas pela leitura a 450 nm.

3. Resultados

Após a seleção pelo *biopanning*, com um *pool* de plasma positivos e negativos para *HTLV-1*, 96 clones de fagos contendo peptídeos de 12 aminoácidos lineares foram testados em um ensaio do tipo ELISA indireto contra o mesmo pool de plasma (Figuras 1 e 2), para verificar a reatividade dos mesmos. Desta forma, foram identificados 46 clones de fagos, contendo peptídeos de 12 aminoácidos, que mostraram razão de densidade óptica, nos testes de ELISA, entre os soros positivos e negativos, maior que 2 (Figura 1), o que demonstra potencial de ser peptídeos miméticos ao vírus estudado.

Entre os 46 bacteriófagos com razão de densidade óptica maior que 2, 4 bacteriófagos obtiveram melhores resultado, fagos B6, E6, F6 e D10.

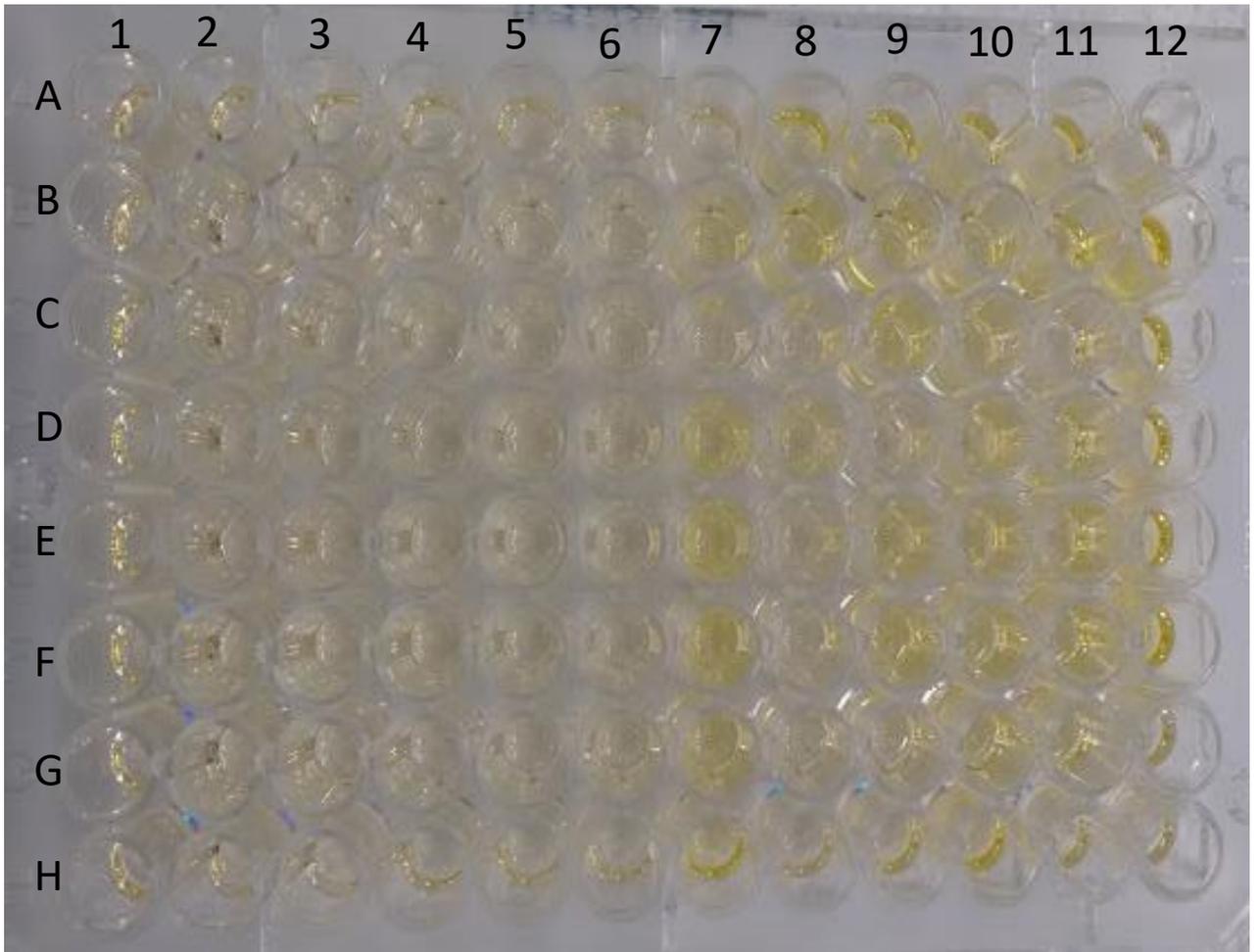


Figura 1: Placa 1 do *Phage-ELISA* para teste de reatividade

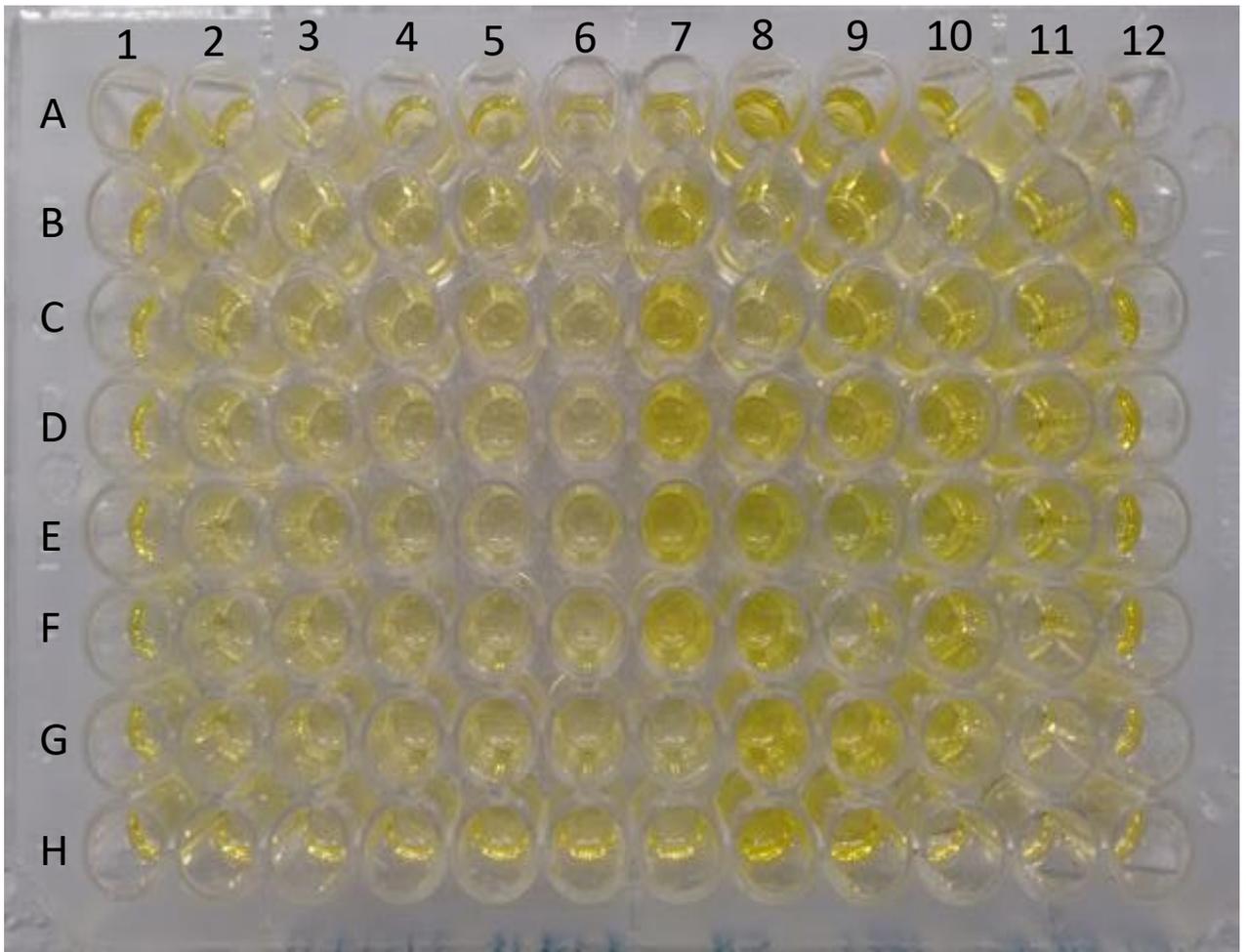


Figura 2: Placa 2 do teste *Phage-ELISA* para teste de reatividade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figura 3- Relação de fagos que mostraram uma relação de densidade óptica, nos testes de ELISA, entre os soros positivos e negativos, maior que 2

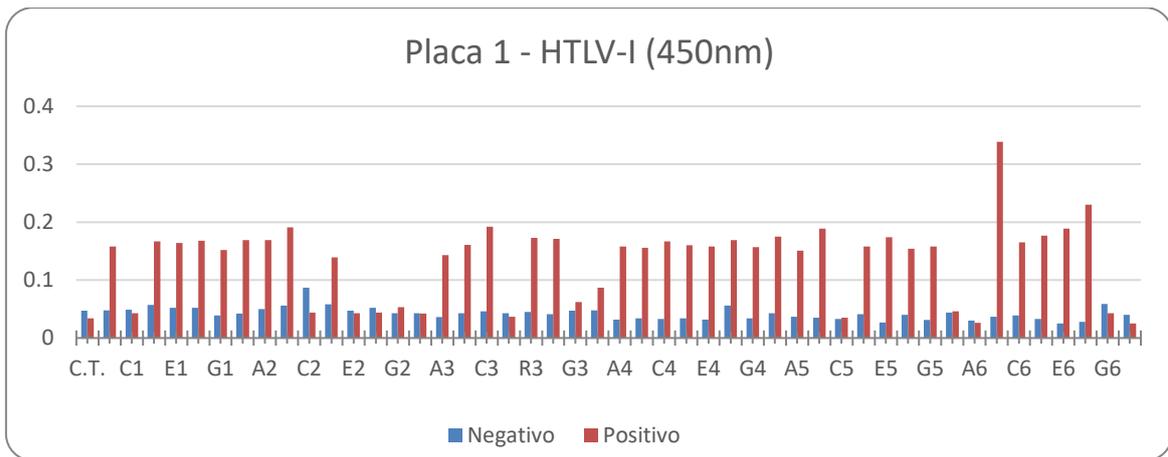


Gráfico 4- Reatividade dos fagos em contato com pool de soro positivo para HTLV-1 em relação aos fagos em contato com pool de soro negativo para HTLV-1

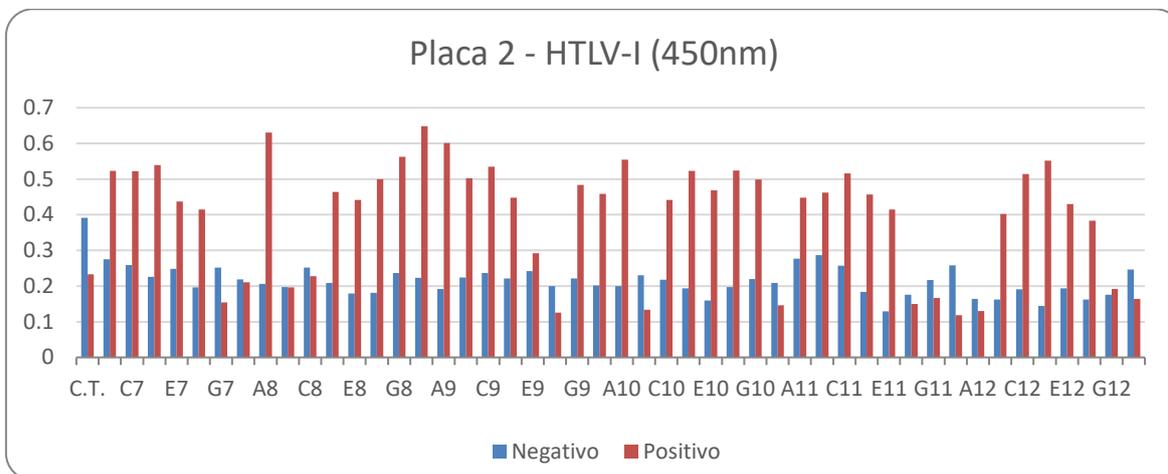


Gráfico 5- Reatividade dos fagos em contato com pool de soro positivo para HTLV-1 em relação aos em fagos em contato com pool de soro negativo para HTLV-1

4. Discussão

No presente estudo, o perfil imunoreativo de peptídeos selecionados por *Phage Display* foi avaliado, demonstrando epítomos com potencial para a detecção da infecção por HTLV-1 e dessa forma, podendo ser utilizados para uma possível aplicação a um diagnóstico diferenciado.

Para o diagnóstico do HTLV-1 é necessário a detecção de anticorpos contra o vírus através de testes sorológicos e a confirmação é feita por Western Blot. Pela grande homologia genética entre o HTLV-1 e o HTLV-2, por muitas vezes, é difícil a diferenciação dos vírus, nesse caso, é necessário o uso da PCR para a confirmação do diagnóstico.¹⁴

O peptídeo ou proteína expresso no capsídeo do fago possibilita a seleção de sequências baseadas na afinidade de ligação de uma molécula alvo em um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning*.^{15,16}

O *biopanning* é feito através de incubação da biblioteca de fagos radomizados com o plasma de pacientes infectadas pelo HTLV-1 e de pacientes controle negativo, em que, os anticorpos ligam-se aos peptídeos expostos nos fagos. No final do processo, os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição.¹⁷

Os resultados encontrados pelo *biopanning* reforçam os dados da literatura onde afirma que é possível realizar triagem de plasma com bibliotecas randômicas de *Phage Display* podendo identificar peptídeos miméticos.¹⁸

Ao realizar o *Phage-Eliza* para analisar a reatividade dos clones selecionados através de IgG dos pacientes portadores de HTLV-1, foi possível constatar que há reatividade dos clones para com as IgG, através da análise, quando expostos com o *pool* de plasma de controle negativo e com o *pool* de plasma controle positivo para HTLV-1, já que o mesmo fago apresenta-se consideravelmente mais reativo quando em contato com o *pool* de plasma de controle positivo ao HTLV-1.

Pode-se observar a eficácia da metodologia de *Phage Display*, uma vez que a afinidade dos bacteriófagos foi testada após os ciclos de seleção, através da técnica *Phage-ELISA*, comprovando o sucesso do *biopanning*.^{19,20}

5. CONCLUSÕES

Por meio da tecnologia de *Phage Display* foi possível selecionar peptídeos imunorreativos contra os anticorpos circulantes em pacientes com HTLV-1, apresentando baixa reatividade com IgGs de indivíduos controles negativos.

Através dos fagos reativos que foram selecionados, poderá ser possível o desenvolvimento de uma nova plataforma para diagnóstico que utiliza os peptídeos expressos pela PIII dos fagos, permitindo um diagnóstico rápido e com baixo custo.

6. Referências

1. Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; et al. Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego; 2011
2. Vrieling H, Reedink H. HTLV-I/II Prevalence in different geographic locations. Transfusion Medicine Reviews 2004; 18(1):46-57
3. Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Soares BCC, Martins ML, Melo GEAB, Martins-Filho AO, Pinheiro SL, Araújo AQC, Galvão-Castro B, Oliveira MSP, Guedes AC, Proietti FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2002b; 35(5):499-508
4. Costa EA, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. J Virol Methods. 2011 May;173(2):280-6
5. Lezin A, Olindo S, Oliere S, Varrin-Doyer M, Marlin R, Cabre P, et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new

criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *Infect Dis.* 2005;191:1830-4.

6. Ishak, R. ; Vallinoto, A. C. R. ; Azevedo, V.; Vicente, A.CP.; Hall, W.; Ishak, M.O.G. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiology and Infection* , v. 135, p. 604, 2007
7. Dias-Neto, E.; Nunes, D. N.; Giordano, R. J.; Sun, J.; Botz, G..H.; Yang, K.; Setubal, J. C.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Next-Generation Phage Display: Integrating and Comparing Available Molecular Tools to Enable Cost-Effective High Throughput Analysis. *PLoS ONE*, v.4, n.12, p.e8338, 2009.
8. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances.* v.19, n.1, p.1-33, 2001.
9. Pande, J.; SzewcZyk, M. M.; Grover, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances.* v.28, n.6, p.849-858, 2010.
10. Posner, B.; Smiley, J.; Lee, I.; Benkovic, S. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends in Biochemical Sciences.* v.19, n.4, p.145-150, 1994.
11. Chen, W.; Zhongyu, Z.; Feng, Y.; Xiao, X.; Domitrov, D. S. Construction of a large phage–displayed human antibody domain library with a scaffold based on a newly identified highly soluble, stable heavy chain variable domain. *Journal of Molecular Biology.* v. 382, n. 3, p. 779-789, 2008.
12. Folgori, A.; Tafi, R.; Meola, A.; Felici, F.; Galfre, G.; Cortese, R.; Monaci, P.; Nicosia, A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera, *EMBO J.* v.13, p.2236-2243, 1994.
13. Bazan, J., Calkosiński, I. and Gamian, A. (2012). Phage display: a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8,1817–1828.
14. Brasil. Ministério da Saúde., Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV. 2013
15. Parmley, S., Smith, G. Antibody-seletable filamentous phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* v. 73, p. 305-318, 1988.
16. Barbas III, C.F.; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. *Phage Display – A Laboratory Manual*, vols. I, II. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, 2001.
17. Smith, G. P. and Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews* 97, 391–410.
18. Zhang. Xiaoli; Han. Xiaoxu; Dai. Di; Bao. Mingjia; Zhang. Zining; Zhang. Zining; Bice. Tristan; Zhao. Min; Gao Yaming; Shang. Hong. Mimotopes selected by biopanning with high-titer HIV-neutralizing antibodies in plasma from Chinese slow progressors, *The Brazilian journal of infectious diseases.* Brazil, 2012, 16(6)-510-512
19. GUNDERSEN, S. G.; HAAGENSEN, I.; JONASSEN, T. O.; FIGENSCHAU, K. J.; DE JONGE, N.; DEELDER, A. M.. Magnetic beads antigen capture enzyme-linked immunoassay in microtitre trays for rapid detection of schistosomal circulating anodic antigen. *J. Immunol.Methods.* Amsterdam. v. 148. n.1-2. p. 1-8. Abr. 1992.
20. GEHRING, A. G.; IRWIN, P. L.; REED, S. A.; TU, S. I.; ANDREOTTI, P. E.; AKHAVAN-TAFTI, H.; HANDLEY, R. S. Enzyme-linked immunomagnetic

chemiluminescent detection of Escherichia coli O157: H7. J. Immunol. Methods. Amsterdam. v. 293. n. 1-2. p. 97-106. Out. 2004.

TIPOS DE CONTRIBUIÇÕES ACEITAS

1. **Artigo original** – trabalho de pesquisa original e inédita, que contribua para o desenvolvimento do conhecimento em uma área específica. Deve ser estruturado, obrigatoriamente, em seis seções principais: Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 4.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

2. **Artigo histórico** – descreve um episódio passado ou uma personalidade que representou grande relevância à área da saúde em um campo de pesquisa, uma profissão, uma descoberta e outros. Texto dividido em seções definidas pelo autor, com títulos e subtítulos de acordo com a abordagem do assunto (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

3. **Artigo** **de** **revisão**

3.1) *Revisão sistemática* – revisão planejada com base no resultado de estudos originais, que procura responder, de forma sintetizada, a um objetivo específico. Descreve, criticamente e em detalhes, os procedimentos empregados na busca, seleção, análise e síntese dos dados dos estudos incluídos na revisão e que são os mais significativos ao tema abordado. Sugere-se observar o *PRISMA Statement (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)*, disponível em [inglês](#) e [português](#). Deve incluir as seções: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

3.2) *Revisão narrativa* – análise crítica, de caráter descritivo-discursivo sobre tema de interesse científico à área da saúde. Deve ser elaborada somente por pesquisadores com vasta experiência na temática abordada (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

4. **Comunicação** – artigo curto sobre um trabalho científico que ainda está sendo realizado, relatando resultados preliminares de pesquisa. Tem a função de dar conhecimento à comunidade científica sobre o andamento de novas descobertas, de maneira rápida, garantindo prioridade ao autor. Deve incluir as mesmas seções que um artigo original (máximo de 2.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

5. **Relato de caso** – descrição de caso clínico importante e bem documentado do ponto de vista clínico e laboratorial. Deve conter Introdução (com breve revisão da literatura), Descrição do Caso, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 3.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

6. **Nota técnica** – contempla guias, sínteses de manuais, recomendações institucionais e roteiros (máximo de 3.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

7. **Carta ao Editor** – manifestação de opinião de leitores sobre artigos publicados pela Revista. Deve trazer comentário consubstanciado sobre tema publicado e/ou sobre assunto polêmico (máximo de 1.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

CRITÉRIOS DE AUTORIA E RESPONSABILIDADE DOS AUTORES

Os critérios de autoria baseiam-se nas resoluções do ICMJE. A autoria reconhecida fundamenta-se em contribuição substancial, relacionada aos seguintes aspectos: (i) idealização e desenho do estudo, análise e interpretação dos dados; (ii) redação ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual do manuscrito; (iii) revisão e aprovação final da versão a ser publicada; e (iv) responsabilidade por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade. Todos os designados como autores devem atender a esses critérios.

No ato da submissão, o manuscrito deve ser acompanhado da **Declaração de Responsabilidade**, assinada por todos os autores, na qual assumem participação na elaboração intelectual de seu conteúdo e responsabilizam-se pela veracidade e originalidade do trabalho, além de atestar que o estudo não foi publicado anteriormente, parcial ou integralmente, nem encaminhado para publicação por outro periódico. Para autores de diferentes locais, é possível enviar cópias assinadas em separado.

FONTES DE FINANCIAMENTO

As fontes de financiamento – privado ou institucional – e o fornecimento de equipamentos, materiais e insumos à pesquisa de forma gratuita ou com desconto devem ser declarados pelos autores no tópico “Apoio Financeiro” dentro do manuscrito.

CONFLITO DE INTERESSES

Conflitos de interesses podem surgir quando autores, revisores ou editores possuem interesses – aparentes ou não – capazes de influenciar no processo de elaboração ou avaliação dos manuscritos. Esses conflitos podem ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira, razão pela qual os autores devem reconhecê-los e revelá-los, quando presentes, no tópico “Conflito de Interesses” dentro do manuscrito.

ASPECTOS ÉTICOS

Trabalhos envolvendo seres humanos ou animais

Devem ter a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição onde a pesquisa foi realizada e cumprir os princípios éticos contidos na Declaração de Helsinki. Para pesquisas realizadas com seres humanos no Brasil, os autores devem observar as normas constantes na Resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, além de atender à legislação pertinente. Não há necessidade de envio de cópia do documento, bastando informar, na seção “Materiais e Métodos”, o nome do CEP, o número do protocolo e a data da aprovação do projeto. Informar também se os pacientes incluídos nos estudos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e se nesse consta o compromisso de preservação da privacidade dos pacientes. Os casos omissos serão analisados pelos Editores.

Proteção dos direitos e privacidade dos pacientes que participam de pesquisas

Informações que possam identificar os participantes da pesquisa ou do relato de caso clínico não serão publicadas, a menos que seja essencial para os propósitos científicos, e o paciente ou seu responsável conceda permissão, por escrito, para a publicação. O consentimento, por escrito, para esses propósitos exige que se mostre ao paciente ou responsável o manuscrito a ser publicado. Na publicação deverá constar que se obteve a autorização. Na busca do anonimato, nunca alterar nem falsificar os dados do paciente. Omitir os detalhes que sirvam para identificar as pessoas, caso não sejam essenciais. Não usar o nome do paciente, suas iniciais ou registro que lhe tiver sido conferido no hospital, especialmente no material ilustrativo.

Ensaio clínico

Artigos que apresentarem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem indicar o número de identificação e a entidade de registro do ensaio validada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo ICMJE.

IDIOMA DO MANUSCRITO E TRADUÇÕES

Os artigos podem ser submetidos em português, inglês ou espanhol. O Núcleo Editorial encarrega-se da tradução para os outros idiomas, sem custo aos autores.

FORMA DE APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS

Estrutura geral do documento

Os trabalhos deverão ser apresentados: em um arquivo .doc/.docx (padrão Microsoft Word); digitados para papel tamanho A4; com tipo de fonte Times New Roman, tamanho 12 pt; com espaçamento simples entre linhas e 6 pt para parágrafos em todo o texto; e margens superior, inferior, esquerda e direita igual a 3 cm.

Primeira página

Área do conhecimento: para facilitar a designação do artigo por tema e Editor, informar em qual área temática o artigo melhor se enquadra. Escolher dentre uma das seguintes:

- 1) Antropologia Médica
- 2) Bacteriologia e Micologia
- 3) Biomarcadores e Bioindicadores
- 4) Desenvolvimento Tecnológico e Inovação em Saúde
- 5) Educação em Saúde e Educação Ambiental
- 6) Entomologia
- 7) Farmácia
- 8) Imunologia
- 9) Parasitologia
- 10) Saúde e Meio Ambiente
- 11) Saúde Pública e Epidemiologia
- 12) Virologia e Arbovirologia

Título: deve ser conciso, informativo e atrativo, de modo que o tema e a área do conhecimento sejam imediatamente reconhecidos. Quando citado o nome de cidade e estado, inserir também o nome do país. Deve ser apresentado centralizado, em negrito e em minúsculo, a exceção de início de frase e nomes próprios.

Autoria: informar os nomes completos de todos os autores, sem abreviação (ao centro e em negrito). Abaixo do nome de cada autor deve conter sua respectiva afiliação completa (ao centro, normal), respeitando-se a hierarquia do órgão, seguida da indicação da cidade, do estado e do país de origem, além do e-mail do referido autor (Ex.: Instituto, Departamento, Laboratório, Cidade, Estado, País – email@mail.com).

Resumo: deve ser apresentado no mesmo idioma do texto, digitado em um único parágrafo, com até 250 palavras. Para manuscritos do tipo Artigo Original, Comunicação e Revisão Sistemática, o resumo deve ser estruturado nas seguintes seções: Objetivo, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusão.

Palavras-chave: indicar de três a seis termos que mais representem o conteúdo central da pesquisa. Sugere-se o uso do vocabulário estruturado de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), criado pelo Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME) com o objetivo de padronizar uma linguagem única de indexação, facilitando a recuperação de documentos científicos.

Endereço para correspondência: informar o nome e o endereço para correspondência do autor responsável pelo contato sobre o trabalho. Deve conter nome completo, endereço completo (preferencialmente institucional), telefone e e-mail.

Corpo do Texto

A estrutura do texto deverá obedecer às orientações de cada categoria de trabalho já descritas anteriormente, de modo a garantir uma uniformidade e padronização dos textos apresentados pela Revista.

Introdução – apresentação do problema, justificativa e objetivo do estudo, nessa ordem, em texto corrido, sem inserir subtópicos.

Materiais e Métodos – deve conter o detalhamento dos materiais utilizados, dos métodos aplicados e, quando pertinente, a descrição e o cálculo do tamanho da amostragem, os procedimentos de coleta de dados, entre outros, de modo que outro pesquisador possa repetir o estudo com os dados fornecidos. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas. No caso de estudo envolvendo seres humanos ou animais, observar o item **Aspectos Éticos** destas Instruções.

Resultados – apresentação dos dados obtidos com a pesquisa, sem interpretá-los ou discuti-los. Podem ser incluídas tabelas e figuras, as quais devem ser autoexplicativas e possuir chamada inserida no corpo do manuscrito, além de oferecer uma leitura direta, simples e clara (ver o item **Ilustrações** destas Instruções).

Discussão – deve apresentar a análise crítica dos resultados, suas implicações e limitações, confrontando-os com os resultados de outras publicações de relevância para o tema.

Conclusão – deve evidenciar o que foi alcançado com o estudo, relacionando os resultados obtidos com as hipóteses levantadas e sugerindo, quando necessário, outros estudos que complementem a pesquisa ou recomendações de ordem prática.

Agradecimentos – (opcional) contribuição de pessoas e/ou organismos que prestaram colaboração técnica e/ou intelectual à pesquisa.

Apoio Financeiro – indicação da existência de financiamento ao desenvolvimento da pesquisa por órgão ou instituição de fomento. Não abreviar nomes de instituições.

Conflito de Interesses – informar a existência ou não de possíveis formas de conflitos de interesse. Essa informação será publicada, caso o trabalho seja aceito.

Referências

Para citação das referências no texto, deve ser utilizado o sistema de chamada numérico sequencial (ordem de aparecimento no texto), que corresponde ao número sobrescrito, sem parêntese, disposto imediatamente após o trecho a que se refere. No caso de mais de uma citação para o mesmo trecho, os números devem ser separados entre si por vírgulas. Evitar o excesso de citação em alguns trechos, elegendo sempre as mais relevantes (máx. 6). As citações diretas (transcrições) serão aceitas apenas em artigos históricos e de antropologia

médica; em outros tipos de artigos, só serão aceitas até três linhas, desde que inseridas no texto (aspadas e sem utilização de recuo).

As referências devem ser listadas ao final do manuscrito, em ordem sequencial numérica, conforme ordem de aparecimento no texto; e normalizadas segundo os Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos. Em referências com mais de seis autores, deve-se listar até os seis primeiros, seguidos da expressão “et al” para os demais; títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo utilizado no *Index Medicus*. Observar os exemplos abaixo:

a) Artigos de periódicos:

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006 Dec;22(12):583-8.

Carvalho RGC, Carneiro ICRS, Pinheiro MS, Pinheiro SC, Azevedo PSR, Santos SD, et al. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2010 mar;1(1):101-6.

- Volume com parte:

Marcus FI. Drug interaction with amiodarone. Am Heart J. 1983;106(4 Pt 2):924-30.

- Volume com suplemento:

Mirra SS, Gearing M, Nash F. Neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology. 1997;49 Suppl 3:S14-6.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saude Publica. 2000 jan;16 supl 2:7-12.

- Número com suplemento:

Wise MS. Childhood nacoletpsy. Neurology. 1998 Feb;50(2 Suppl 1):S37-42.

Mello Jorge MHP, Gawryszewski VP, Latorre MR. Análise dos dados de mortalidade. Rev Saude Publica. 1997 ago;31(4 supl):5-25.

- Em fase de impressão:

Oliveira SV, Gurgel-Gonçalves R. Análise preditiva da distribuição geográfica de hantavírus no Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. No prelo 2013.

Stewart WC, Geiger AC, Jenkins JN. The benefit of repeated intraocular pressure measurements in clinical trials. Arch Ophthalmol. In Press 2014.

b) *Livros:*

Leão RNQ, coordenador. Medicina tropical e infectologia na Amazônia. Vol. 1. Belém: Samauma; 2013.

Fletcher RH, Fletcher SW, Fletcher GS. Clinical epidemiology. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

- *Autoria institucional:*

World Health Organization. Communicable disease alert and response for mass gatherings: key considerations. Geneva: WHO; 2008.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral (Mato Grosso). Informativo populacional e econômico de Mato Grosso: 2008. Cuiabá: Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral; 2008.

- *Capítulos de livro:*

- Quando o autor do capítulo não é o mesmo do livro

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1787-833.

Dewey WL, Martin BR. Abuso de drogas. In: Craig CR, Stitzel RE. Farmacologia moderna: com aplicações clínicas. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kroogan; 2011. p. 380-94.

- Quando o autor do capítulo é o mesmo do livro

Cefrey H. Yellow fever. New York: Rosen; 2002. Prevention and control; p. 48-56.

Contanzo LS. Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Neurofisiologia; p. 65-110.

c) *Teses, Dissertações e Monografias:*

Bührer-Sékula S. Simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* [thesis]. Amsterdam (NL): Royal Tropical Institute; 1998.

Queiroz ML. A hanseníase no Estado de Mato Grosso [dissertação]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Saúde Coletiva; 2009. 137 p.

d) Portarias e Leis:

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do SUS. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2012 mar 29; Seção 1:95.

Brasil. Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Decreta a obrigatoriedade do Programa de Controle de Infecção Hospitalar em todos os hospitais brasileiros. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 1997 jan 7; Seção 1:165.

e) Anais de Congresso:

Dittmar A, Beebe D, editors. 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology; 2000 Oct 12-14; Lyon, France. Piscataway (NJ): IEEE; 2000. 643 p.

Anais do 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2015 jun 14-17; Fortaleza, Brasil. Brasília (DF): Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2015. 2078 p.

f) Trabalho de evento publicado em periódico:

Ohnishi MDO, Ventura AMRS, Libonati RF, Souza JM. O pulmão na malária *vivax*: relato de caso. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2º Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul e 3º Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa; 2008 mar 4-7; Porto Alegre, RS. Brasília (DF): Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2008. p. 215. (Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; vol. 41; supl. 1).

g) Documentos eletrônicos:

- Livros e periódicos na Internet

World Health Organization. International health regulations: 2005 [Internet]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2008 [cited 2013 Dec 11]. Available from: <http://www.who.int/ihr/publications/9789241596664/en/>.

Lucena AR, Velasco e Cruz AA, Cavalcante R. Estudo epidemiológico do tracoma em comunidade da Chapada do Araripe - Pernambuco Brasil. Arq Bras Oftalmol

[Internet]. 2004 mar-abr [citado 2004 jul 12];67(2):197-200. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v67n2/19740.pdf>.

- *Websites e base de dados na Internet*

PubMed Central [Internet]. Bethesda (MD): NCBI/NLM; 2015 [updated 2014 Aug 15; cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Pará [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2015 [citado 2015 mar 23]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=15&search=para>.

Ilustrações

São aceitas, no máximo, seis ilustrações, que podem ser do tipo tabela, quadro, figura, gráfico ou mapa. Caso os autores julguem essencial que uma determinada ilustração permaneça, se extrapolado o número máximo permitido, solicita-se um contato especial com o Núcleo Editorial. Cada ilustração deve ser apresentada em folha separada ao final do artigo, numerada na ordem de aparecimento no texto e conter um título sucinto, porém explicativo, bem como suas respectivas legendas (quando houver). Ilustrações que não sejam de autoria dos mesmos autores do manuscrito só serão publicadas caso o criador/produtor/autor da ilustração conceda autorização para publicação nesta Revista.

- *Tabelas e quadros:*

Devem complementar, e não duplicar, o texto. Recomenda-se seguir Normas de Apresentação Tabular da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas (rodapé) da tabela/quadro e não no título, identificadas por símbolos nesta ordem: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas/quadros e não usar espaços para separar colunas. Para as células que apresentarem dado com valor igual a zero, substituir o "0" por "-" e inserir no rodapé a seguinte nota: "Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento".

- *Figuras:*

Podem ser submetidas em preto ou em cores. Fotografias e mapas devem ser enviados sob a forma de arquivos nos formatos JPG ou TIFF, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72

dpi. Imagens geradas em computador, como gráficos e esquemas, podem ser anexadas sob os formatos DOC, XLS, PSD, ou CDR. O Núcleo Editorial reserva-se o direito de configurar o material ilustrativo de modo mais econômico, desde que não prejudique sua apresentação. Os autores são convidados a submeter, para consideração da Revista, ilustrações de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Unidades de medida

As unidades de medida devem seguir os padrões do Sistema Internacional de Unidades.

Siglas e Acrônimos

Siglas são palavras formadas a partir da redução de um grupo de palavras, onde cada letra é pronunciada separadamente (Ex.: OMS – Organização Mundial da Saúde, AVC – acidente vascular cerebral); escritas em maiúsculas, a exceção das originalmente grafadas de forma diferenciada (Ex.: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Acrônimos são palavras formadas a partir da junção de letras ou sílabas iniciais de um grupo de palavras, formando vocábulos. São escritos apenas com a inicial maiúscula (Ex.: Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz, Funasa – Fundação Nacional de Saúde), a exceção das que possuem menos de quatro letras que devem ser grafadas todas em maiúsculas (Ex.: ONU – Organização das Nações Unidas).

Para siglas e acrônimos estrangeiros, recomenda-se a designação correspondente em português, se a forma traduzida for largamente aceita; ou sua utilização na forma original se não houver correspondência em português, ainda que o nome por extenso em português não corresponda à sigla. (Ex: UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, CDC – Centers for Disease Control and Prevention).

Em sua primeira aparição no texto, siglas e acrônimos deverão ser escritos por extenso e acompanhados da respectiva redução entre parênteses. A partir daí, utilizar apenas a sigla ou acrônimo no restante do texto.

Um caso excepcional é o da palavra "aids" (síndrome da imunodeficiência adquirida), que o Conselho Nacional de Aids, do Ministério da Saúde, recomenda, dada a popularização do

acrônimo original "Aids – acquired immunodeficiency syndrome", que seja grafada em minúsculas, representando o nome da doença.

ENVIO DE MANUSCRITOS

Os trabalhos devem ser enviados por meio do Sistema de Submissão da Revista. Juntamente com o arquivo do manuscrito, os autores devem enviar a "Declaração de Responsabilidade", assinada por cada um deles, digitalizada em formato PDF.

Os autores podem enviar um documento à parte com a indicação de até três possíveis revisores, também especialistas no assunto abordado em seu manuscrito. É possível ainda indicar até três revisores especialistas para os quais não gostariam que seu manuscrito fosse submetido. Caberá aos Editores a decisão de acatar ou não as sugestões dos autores.

AVALIAÇÃO E PUBLICAÇÃO

Depois de submetido, o trabalho passa por dez etapas no trâmite editorial. Ressalta-se que ele só passará para a fase seguinte se aprovado na anterior. São elas:

- 1) Análise técnica:** realizada pelo Núcleo Editorial, que verifica se o manuscrito foi formatado segundo essas normas e se o assunto se enquadra no escopo da Revista; além de realizar a busca por possíveis transcrições sem o devido crédito à fonte original ou qualquer outro ponto que possa atestar contra sua originalidade.
- 2) Análise inicial:** realizada por um Editor Associado, designado com base na área do manuscrito, que analisa seu potencial para publicação e seu interesse para os leitores da Revista, além de verificar se os preceitos éticos foram obedecidos. Trabalhos que não atenderem a essas exigências serão recusados.
- 3) Análise de mérito científico:** após a avaliação pelo Editor, os manuscritos serão enviados para avaliação "cega" (não identificada) por dois revisores especialistas (*peer reviewers*). No caso de pareceres divergentes, um terceiro será consultado. A partir dos pareceres recebidos, os Editores poderão considerar o manuscrito: (i) Aceitável para publicação; (ii) Aceitável, condicionado a reformulação; ou (iii) Não aceitável. Os trabalhos aceitos para publicação, porém condicionados à reformulação, serão enviados aos autores com prazo definido para devolução do manuscrito reformulado ao Núcleo Editorial.

Uma vez aprovado para publicação, se, todavia, for identificada a necessidade de pequenas correções e ajustes no texto, os Editores da Revista reservam-se o direito de fazê-lo.

4) Revisão textual: de posse do manuscrito reformulado pelos autores, o Núcleo Editorial encaminha-o para normalização e revisão ortográfica e gramatical. O texto revisado é devolvido aos autores para aprovação e uma resposta deve ser dada até o prazo estipulado; caso contrário, todas as modificações serão consideradas aceitas. No caso de haver comentários, todos deverão ser respondidos pelos autores.

5) Avaliação final: onde o artigo, agora reformulado e revisado, retorna aos pareceristas para aprovação de sua versão final.

6) Aprovação: finalmente, a decisão definitiva pela publicação do manuscrito será condicionada à aprovação final dos pareceristas e ao atendimento de todos os requisitos estabelecidos nestas normas. A comunicação oficial será enviada por e-mail ao autor de correspondência.

7) Diagramação: fase em que o manuscrito ganha o formato de como será publicado.

8) Leitura de prova: o artigo diagramado na versão final a ser publicada é então encaminhado por e-mail, em formato PDF, ao autor de correspondência para ser lido, verificado e aprovado pelos autores, o qual deverá também assinar e enviar, em formato PDF ou JPG, a Declaração de Transferência de Direitos Autorais Patrimoniais para Publicação. Para não comprometer a publicação do trabalho, a resposta sobre a aprovação ou não da prova e o envio da Declaração assinada devem cumprir o prazo estipulado. Inclusões de informações não serão aceitas nesta fase.

9) Publicação: fase final em que o manuscrito está pronto e apto para inclusão em um dos fascículos da Revista. A publicação está condicionada ao recebimento, pelo Núcleo Editorial, do documento de transferência de direitos assinado.

10) Tradução: todos os artigos publicados são traduzidos pelo Núcleo Editorial para os outros dois idiomas, sem custos aos autores. A versão traduzida, já diagramada, é encaminhada ao autor de correspondência para aprovação e, então, publicada eletronicamente.

Toda vez que o manuscrito passar para uma próxima fase, é enviado um comunicado por e-mail ao autor de contato para acompanhamento.

DIREITO DE REPRODUÇÃO

Os manuscritos publicados pela Revista Pan-Amazônica de Saúde são de propriedade de seus respectivos autores. Entretanto, sua reprodução – total ou parcial – por outros periódicos ou meios de comunicação, tradução para outro idioma ou criação de vínculos eletrônicos são permitidas somente mediante autorização expressa dos editores.