



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA**

SARA DE MEDINA BATISTA PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *TAX* DO HTLV-1
DE SEQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES FORMAS
CLÍNICAS**

SALVADOR – BA

2023

SARA DE MEDINA BATISTA PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *TAX* DO HTLV-1
DE SEQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES FORMAS
CLÍNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Luciane Amorim Santos

SALVADOR – BA

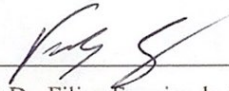
2023

SARA DE MEDINA BATISTA PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE TAX DO HTLV-1 DE SEQUÊNCIAS
DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS EXTRAÍDAS
DE BANCOS DE DADOS**

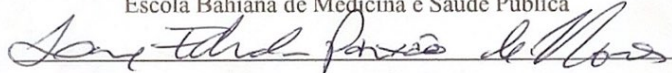
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 10 de novembro de 2023.



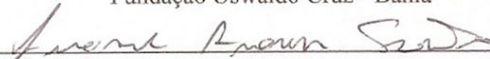
Prof. Dr. Filipe Ferreira de Almeida Rego

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Msc. Laise Eduarda Paixão de Moraes

Fundação Oswaldo Cruz - Bahia



Prof.ª Dr.ª. Luciane Amorim Santos

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, quem me capacita a fazer todas as coisas. Por Ele e para Ele é tudo que faço. À minha mãe, Edlena, que sempre me incentivou, me amou, acreditou em mim e me deu tudo o que precisei.

Aos meus amigos, que tem me sustentado em oração durante todo esse período. Pude receber o amor e poder de Deus através da vida de vocês.

Ao meu namorado, Mateus, por toda a compreensão, carinho e cuidado.

De forma muito especial, à Marina, por todo o suporte emocional, espiritual e técnico. Obrigada pela disponibilidade e serviço. Ter você tão perto nesse período me levou a perceber o cuidado de Deus com a minha vida.

Aos colegas da Bahiana e da Fiocruz, pelos ensinamentos compartilhados, incentivo e por estarem sempre por perto com algum conselho. Início minha vida profissional levando uma parte de vocês.

À minha orientadora, Luciane, por abrir as portas da ciência para mim e sempre me estimular a dar o meu melhor. Agradeço com todo o coração pela confiança e oportunidade que recebi.

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO	6
2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO	28

1. Artigo Científico

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE *TAX* DO HTLV-1 DE SEQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS

CHARACTERIZATION OF HTLV-1 GENE *TAX* OF SEQUENCES FROM INDIVIDUALS WITH DIFFERENT CLINICAL OUTCOMES

Sara de Medina Batista Pimentel ¹, Msc. Marina Silveira Cucco ² e Dr^a. Luciane Amorim Santos^{1,2}

¹Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.

²Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

Autor correspondente: Luciane Amorim Santos, biomédica e doutora pelo curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Silveira Martins, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil. Telefone para contato: (71)99940-2447. E-mail para contato: lucianeamorim@bahiana.edu.br.

Resumo

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1) afeta de 5 a 10 milhões de indivíduos mundialmente. A infecção pode ser assintomática ou levar ao desenvolvimento de doenças associadas, como a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) e o Linfoma de Células T do Adulto (ATL). A ação da proteína Tax é essencial na patogênese dessas doenças. O objetivo deste estudo é avaliar as variações genéticas no gene *Tax* do HTLV-1 em sequências disponíveis em base de dados e estabelecer possíveis relações entre as mutações e o desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1. Os bancos de dados GenBank e *HTLV-1 Molecular Epidemiology Database* foram utilizados para a identificação das sequências incluídas. Os programas MAFFT e AliView foram utilizados para alinhamento com a sequência referência, seleção da região genômica de interesse e identificação das mutações. O efeito das mutações nas propriedades físico-químicas da proteína e nos sítios de modificações pós traducionais foram analisados na plataforma PRABI e as análises estatísticas realizadas no GraphPad Prism. Foram incluídas 336 sequências e quatro mutações não-sinônimas foram identificadas numa frequência entre 5 e 95% das sequências: M107V, I170V, A219V e N230H. A mutação A219V foi mais frequente em pacientes com HAM/TSP com suporte estatístico e alterou propriedades físico-químicas da proteína. As outras mutações não apresentaram associação com perfil clínico, mas alteraram propriedades físico-químicas da proteína. A mutação A219V pode estar relacionada ao desenvolvimento de HAM/TSP, contudo são necessárias outras análises, como análises funcionais, e correlações adicionais com outros fatores.

Palavras-chave: HTLV-1; genoma; Tax.

Abstract

Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) affects 5 to 10 million individuals worldwide. The infection can be asymptomatic or lead to the development of associated diseases, such as Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP) and Adult T-cell Lymphoma (ATL). The action of the Tax protein is essential in the pathogenesis of these diseases. This study aims to evaluate the genetic variations in the HTLV-1 gene Tax in sequences available in the database and to establish possible relationships between mutations and the development of diseases associated with HTLV-1. The GenBank and HTLV-1 Molecular Epidemiology Database databases were used to identify the included sequences. The MAFFT and AliView programs were used to align with the reference sequence, select the genomic region of interest, and identify mutations. The effect of mutations on the physicochemical properties of the protein and on post-translational modification sites was analyzed in the PRABI platform and the statistical analyses were performed in GraphPad Prism. 336 sequences were included, and four non-synonymous mutations were identified at a frequency between 5 and 95% of the sequences: M107V, I170V, A219V, and N230H. The A219V mutation was more frequent in patients with HAM/TSP with statistical support and altered the physicochemical properties of the protein. The other mutations showed no association with the clinical profile but altered the physicochemical properties of the protein. The A219V mutation may be related to the development of HAM/TSP, however other analyses are needed, such as functional analyses, and additional correlations with other factors.

Keywords: HTLV-1; genome; Tax.

Introdução

O Vírus Linfotrópico da Célula T Humana do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus humano, onde estima-se que há de 5 a 10 milhões de pessoas vivendo com o vírus no mundo¹. No continente americano, o Brasil é o país com o maior número de casos, com aproximadamente 800.000 infectados¹, sendo a maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste². A capital baiana, Salvador, é uma das cidades de maior prevalência, com estimativa de 1,7% da população geral infectada³, sendo uma das microrregiões da Bahia com o maior número de casos por 100.000 habitantes (22,9), junto a Barreiras (24,83) e Ilhéus-Itabuna (22,6)⁴. No entanto, apesar do grande número de casos, o HTLV-1 é uma infecção negligenciada.

A infecção por HTLV-1 pode seguir em um quadro assintomático, observado na maioria dos infectados, ou culminar no desenvolvimento de doenças associadas ao vírus, como o Linfoma de Células T Adultas (ATL), a Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) e a Dermatite Infecciosa associada ao HTLV-1 (IDH)^{5,6,7}. No entanto, apesar de a maioria dos indivíduos afetados serem classificados como assintomáticos (ACs), existem sintomas inespecíficos, como disfunção urinária e comprometimento neurológico sutil, que são frequentemente relatados por indivíduos desse grupo.

Pouco se sabe sobre os fatores que levam ao desenvolvimento desses diferentes perfis clínicos nas pessoas vivendo com o HTLV-1. Diversos fatores virais e do hospedeiro parecem contribuir com a patogênese da infecção colaboram para o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1. Entre eles estão a via de infecção, a carga proviral, mutações no genoma viral e a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro^{8, 19, 20, 21, 22, 23}.

O genoma do HTLV-1 possui 9032 nucleotídeos⁹ e é composto pelos genes *gag* (capsídeo viral), *pol* (enzimas virais) e *env* (envelope viral), e por uma região que codifica as proteínas regulatórias e acessórias (*região pX*)¹⁰, incluindo HBZ e Tax. A proteína Tax desempenha um papel ativador na regulação da expressão gênica, sendo essencial para a replicação viral e proliferação celular, assumindo assim um protagonismo na patogênese da infecção por HTLV-1¹⁰. Flanqueando o genoma, estão as regiões de repetição terminal longa (*Long Terminal Repeats* - LTR), que abrigam os sítios de ligação dos fatores de transcrição, relacionando-se assim, com a replicação e transcrição viral¹¹.

Em indivíduos com ATL, a resposta imune do hospedeiro colabora para o aumento da carga proviral através da expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ infectados¹². Já em pacientes com HAM/TSP, a resposta imune exacerbada desencadeada por linfócitos T citotóxicos (CTLs) gera um processo inflamatório que resulta na degeneração das células gliais, promovendo a

perda progressiva dos movimentos^{13,14}. Nesse sentido, em ambas as doenças, Tax, em conjunto com HBZ, desempenha um papel central, sendo a responsável pela transativação viral que induz a proliferação de linfócitos descontrolada na ATL¹⁵ e o principal alvo da resposta imune celular mediada por CTLs em pacientes com HAM/TSP¹².

Considerando que mutações genéticas podem produzir alterações nas proteínas virais, acredita-se que fatores genéticos virais e do hospedeiro podem influenciar no curso da doença. Nesse sentido, a busca por variações no genoma do vírus tem sido alvo de diversos estudos e, algumas mutações, por afetar as funções das proteínas que codificam, já foram correlacionadas ao risco de desenvolvimento de HAM/TSP e ATL, como a mutação G29S (*região pX*), que interfere no reconhecimento e ativação celular executados pelas proteínas p12 e p8¹⁶. Além disso, foram identificados padrões de mutações exclusivos em grupos de indivíduos com diferentes perfis clínicos, como as mutações C39Y (HAM/TSP) e F84L (ATL), ambas na ORF-I da *região pX*, as quais podem influenciar no desfecho clínico¹⁷. Ademais, mutações como R119Q (HBZ), mais frequente em ACs, podem ser um fator protetor contra o desenvolvimento das doenças associadas¹⁸.

Dada a necessidade de esclarecimento dos fatores virais da patogênese da infecção por HTLV-1 e possível associação aos diversos desdobramentos clínicos observados, esse trabalho teve como objetivo avaliar as variações genéticas na região genômica de *tax* do genoma do HTLV-1 em sequências obtidas em base de dados e estabelecer possíveis relações entre as mutações genéticas e o desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1.

Metodologia

Coleta de sequências de banco de dados e montagem de conjunto de dados

Para caracterizar as mutações da *região tax* do HTLV-1 e comparar a frequência de mutações identificadas em sequências isoladas de pessoas com diferentes formas clínicas causadas pelo HTLV-1, foi construído um conjunto de dados a partir de sequências disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e na *HTLV-1 Molecular Epidemiology Database* (<http://htlv1db.bahia.fiocruz.br>).

A busca por sequências no GenBank foi realizada utilizando a chave de busca “(HTLV-1 OR "Human T-cell leukemia virus type I") AND (tax OR pX OR "complete genome" OR "full genome")” e os resultados foram filtrados por taxonomia, sendo selecionadas as sequências pertencentes ao vírus. Para buscar as sequências na *HTLV-1 Molecular Epidemiology Database* foram usados como filtros as regiões genômicas “*env-pX*”, “*gag-pol-env-pX*”, “*pX*” e “*complete genome*”.

Depois de extraídas as sequências disponíveis, foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: (i) sequências duplicadas, (ii) sequências com menos de 700pb e (iii) sequências sem dados clínicos disponíveis. Para isso foi realizada a busca e curadoria dos dados clínicos nas bases de dados e nos artigos de origem. As sequências selecionadas para o estudo foram alinhadas juntamente com a sequência referência ATK1 (J02029.1) usando o MAFFT e o alinhamento foi visualizado no programa AliView v. 1.28.

Caracterização molecular da região Tax

A partir do alinhamento, as mutações genéticas presentes nas sequências foram identificadas por contagem direta de nucleotídeos usando o programa AliView v. 1.28.

Para analisar se as mutações identificadas em Tax alteravam características das proteínas, os perfis físico-químicos das proteínas mutadas foram traçados e comparados com a referência (ATK1), utilizando a plataforma PRABI (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>). Foram avaliadas as seguintes propriedades físico-químicas: hidrofília, hidropatia, flexibilidade, antigenicidade A e B (dois algoritmos diferentes), acessibilidade e hélice enterrada na membrana. Os perfis físico-químicos foram plotados utilizando o programa GraphPad Prism 10. A fim de determinar se as mutações ocorriam em domínios de Tax e prever possíveis impactos funcionais na proteína, foi realizada busca pela localização das variações de nucleotídeo na sequência de Tax, utilizando a base de dados UniProt

(<https://www.uniprot.org/>). Ademais, foi utilizada a plataforma PRABI para identificar se alguma das mutações ocorriam em sítios de modificação pós-traducionais.

Análises estatísticas

Para detectar a variação das frequências das mutações nos diferentes grupos clínicos, foram realizadas análises estatísticas utilizando o GraphPad Prism 10. O teste de chi-quadrado foi aplicado para comparar a frequência das mutações entre todos os grupos e identificar possíveis assinaturas associadas a um perfil clínico. Para identificar variações que possam diferenciar ACs e indivíduos com outras formas clínicas, foi performado o teste exato de Fisher aos pares, considerando o grupo AC como controle e as outras formas clínicas como a segunda variável (HAM/TSP, ATL e IDH). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para reduzir a possibilidade de erro do tipo I, foi aplicado o método de Bonferroni para corrigir os testes realizados.

Resultados

A busca realizada no GenBank resultou em um total de 1631 sequências e a busca na base de dados específica de HTLV-1 (*HTLV-1 Molecular Epidemiology Database*) resultou em 789 sequências. A partir dessas buscas, foi criado um conjunto de dados com 2420 sequências, do qual foram excluídas as sequências (i) em duplicata ($n = 479$) e (ii) com menos de 700pb ($n = 873$), restando 1068 sequências. Dessas, foi realizada a checagem das informações clínicas, tanto nas bases de dados quanto nos artigos de origem, e aquelas que não possuíam forma clínica associada foram excluídas ($n = 729$), restando 339 sequências. Com estas, foi realizado o alinhamento utilizando a sequência referência ATK1 (J02029.1) e após o alinhamento, as sequências que compreendiam a região de interesse do genoma para o estudo (Tax = 1056pb) foram incluídas, totalizando 336 sequências. Entre estes isolados, 125 são de ACs, 123 de HAM/TSP, 83 de ATL e 5 de IDH (Figura 1).

Na análise das sequências foram identificadas 268 mutações, das quais apenas nove apresentaram frequência entre 5% e 95% das amostras. Essas nove mutações são classificadas como variações de nucleotídeo único (SNVs), e dentre essas, cinco eram do tipo sinônimas e quatro não-sinônimas (i. e. alteram o aminoácido). As mutações não-sinônimas M107V, I170V, A219V e N230H foram encontradas em isolados de ACs, HAM/TSP e ATL. Apenas a mutação A219V foi encontrada em isolados de todas as manifestações clínicas (ACs, ATL, HAM/TSP e IDH). As frequências individuais das variações em cada forma clínica estão descritas na Tabela 1.

Na comparação das frequências das mutações entre todos os grupos, foi observada uma diferença com suporte estatístico para a mutação A219V. Na análise aos pares, quando comparada a frequência das mutações entre ACs e os demais grupos clínicos, apenas a presença da mutação A219V apresentou suporte estatístico, com menor frequência em indivíduos com HAM/TSP e IDH em relação aos ACs ($p = 0,000034$ e $p = 0,002$, respectivamente) (tabela 2).

A análise físico-química da sequência de aminoácidos de Tax para avaliar o impacto dessas mutações revelou alterações causadas pelas quatro mutações identificadas (Figura 2). A variação N230H foi a que mais provocou alterações nas propriedades físico-químicas da proteína, aumentando a hélice enterrada na membrana e antigenicidade B, e diminuindo a hidrofília, flexibilidade, antigenicidade A e acessibilidade daquela região. Por outro lado, a variação I170V resultou na alteração de apenas uma propriedade, o aumento da antigenicidade

B. Ambas as variações M107V e A219V provocaram aumento da hidropatia e redução da antigenicidade A das regiões mutadas. No entanto, dentre as duas, o aumento da antigenicidade B somente foi observado como consequência da variação M107, e a diminuição da hidrofília, da variação A219V (Figura 2 e Tabela 3).

Em relação à localização das variações de nucleotídeo na proteína Tax, verificou-se que a variação M107 ocorre em uma região de interação com a proteína IKBKG. Já as variações A219V e N230H estão localizadas em regiões de homodimerização da proteína Tax, e a variação I170V foi encontrada em uma região de Tax ainda não caracterizada pela literatura. Além disso, nenhuma das variações de AA aqui descritas foram localizadas em sítios de modificações pós-traducionais.

Discussão

A infecção pelo HTLV-1 pode levar ao desenvolvimento das doenças associadas, e os mecanismos que conduzem às diferentes formas clínicas ainda não são completamente compreendidos. No entanto, fatores como a carga proviral e a presença de algumas mutações no genoma viral já foram correlacionados ao desenvolvimento e progressão das doenças associadas à infecção^{19, 20, 21, 22, 23}. Além disso, já foi demonstrado que algumas variações de ocorrência natural em Tax podem afetar o reconhecimento da célula infectada pelos linfócitos T citotóxicos e a capacidade transativadora da proteína de ativar alguns promotores^{24, 25}. Assim, sabendo que alterações genéticas podem alterar a funcionalidade da proteína traduzida, acredita-se que mutações em Tax podem influenciar a patogênese da infecção e o desdobramento clínico observado. Nesse sentido, Tax tem sido alvo de estudos e achados como o de Furukawa e colaboradores, que relatam uma associação entre variações nucleotídicas em Tax e o desenvolvimento de HAM/TSP, impulsionam a investigação desse gene para elucidar os mecanismos patogênicos da infecção por HTLV-1. A fim de colaborar com a literatura já existente e esclarecer os fatores associados à diferenciação clínica da infecção por HTLV-1, foram avaliadas nesse estudo 336 sequências de Tax provenientes de indivíduos afetados com diferentes formas clínicas (ACs, HAM/TSP, ATL e IDH) e demonstrado que a mutação A219V pode ser um fator de desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1.

A mutação A219V foi identificada nas quatro formas clínicas da infecção por HTLV-1 abordadas nesse estudo (AC, HAM/TSP, ATL e IDH) e relacionada, com suporte estatístico, ao desenvolvimento de HAM/TSP e IDH. No entanto, ao analisar esses resultados, é preciso considerar a falta de representatividade das sequências de isolados de IDH - dentre as quais 100% possuíam a mutação A219V - uma vez que apenas 5 sequências foram incluídas, todas provenientes de um mesmo estudo e mesma região geográfica. Por outro lado, a maior frequência desta mutação em isolados de HAM/TSP indica a possibilidade de essa ser um fator de desenvolvimento da doença.

Assim como as variações A221V e S304N descritas por Nozuma e colaboradores²⁶, a variação A219V foi encontrada, com suporte estatístico, predominantemente em indivíduos com HAM/TSP em comparação a ACs. Entretanto, vale ressaltar que as sequências avaliadas por Nozuma e colaboradores possuíam informações de subtipo associadas, diferente do presente estudo, o que permitiu a associação dessas mutações ao subtipo transcontinental, levando à conclusão de que as mutações evidenciadas estariam mais associadas à origem

geográfica do que ao desfecho clínico da infecção. Dessa forma, por consequência do déficit de metadados associados às sequências extraídas das bases de dados analisadas neste trabalho, e a consequente não associação das mutações a um subtipo do HTLV-1, não se pode confirmar que a variação A219V, identificada no presente estudo, está associada apenas ao desdobramento clínico, existindo a possibilidade de essa ser uma mutação característica de um subtipo viral. E, visto que o subtipo viral já foi associado a um maior risco de desenvolvimento das doenças associadas^{22,26}, ter essa informação seria de extrema valia para a interpretação dos resultados.

As regiões nas quais as variações de aminoácidos são encontradas na sequência da proteína também podem fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento das doenças associadas, sobretudo por ser um indicativo das funções de Tax possivelmente afetadas. A mutação M107V, também identificada neste estudo, apesar de não associada a uma forma clínica específica, foi identificada em uma região de interação com a proteína IKBKG, um adaptador na via de sinalização do fator nuclear kappa-B (NF-kB). O NF-kB é o complexo proteico responsável por regular a expressão dos genes envolvidos na resposta imune, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas, proliferação celular e outros mecanismos inflamatórios²⁵.

Na infecção por HTLV-1, a hiperativação desse fator por Tax pode promover a proliferação descontrolada de linfócitos T e levar à transformação celular, culminando no desenvolvimento de ATL^{15,28}. Alternativamente, a ativação prolongada do NF-kB pode contribuir para a cronificação da inflamação, como ocorre na patogênese da HAM/TSP²⁹. Dessa forma, uma variação na sequência dos aminoácidos que interagem com IKBKG pode prejudicar a ativação do NF-kB, afetando a indução das respostas inflamatórias e imunológicas pelo hospedeiro, e, conseqüentemente, o desdobramento clínico da infecção por HTLV-1. Além disso, verificou-se que a mutação M107V altera algumas propriedades físico-químicas da proteína traduzida – aumento da hidropatia e antigenicidade B e redução da antigenicidade A, o que também pode interferir na sua interação com IKBKG, afetando o desfecho clínico da infecção.

Ademais, as mutações A219V e N230H foram localizadas em uma região de homodimerização da proteína, já descrita como relevante para o desempenho da atividade transativadora de Tax³⁰. Sendo assim, as alterações físico-químicas geradas por essas variações – aumento da hidropatia e diminuição da hidrofilia e antigenicidade A (A219V) e aumento da hélice enterrada na membrana e antigenicidade B e diminuição da flexibilidade e acessibilidade

(N230H) - podem alterar a estrutura de Tax, afetando a atividade da proteína. No entanto, nesse estudo não foi avaliada a funcionalidade da proteína, não sendo possível determinar se, de fato, essas mutações geram consequências funcionais, sendo necessária a realização de estudos de caráter funcional para compreender melhor o impacto dessas alterações.

Uma vez que as sequências analisadas foram extraídas de bases de dados, e então provenientes de diferentes estudos e regiões geográficas, alguns vieses de amostragem, localização e estratégia de sequenciamento foram minimizados. Apesar disso, vale ressaltar que ao avaliar o risco de desenvolvimento de doenças entre indivíduos de diferentes áreas geográficas, além do genoma, outros fatores podem influenciar no desdobramento clínico, como fatores ambientais e sociais^{21,31}. Outro viés de amostragem pode ser gerado pelo tamanho limitado da população com IDH, assim, os resultados que envolvem as análises com indivíduos desse grupo clínico devem ser analisados cuidadosamente. Além disso, uma vez que as informações de subgrupo não foram incluídas nas análises, a distribuição desigual dos diferentes subgrupos de HTLV-1 nas sequências analisadas pode gerar viés. Tanto o número reduzido de indivíduos com IDH, quanto a não inclusão da análise de subgrupo no estudo se dão, principalmente, pela falta de metadados associados às sequências publicadas em bases de dados. Isso reflete a negligência acerca da infecção por HTLV-1 e suas doenças associadas, apesar da necessidade de elucidação da sua patogênese para o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes.

Esse estudo colabora para um melhor entendimento dos fatores atrelados aos desdobramentos clínicos da infecção por HTLV-1, sobretudo as mutações genéticas, as quais podem afetar as funções proteicas virais. Os achados deste trabalho podem ser úteis como base para a realização de estudos funcionais que descrevem o impacto das alterações identificadas no comportamento viral. Além disso, a descrição das mutações presentes em domínios proteicos de Tax junto à identificação das características físico-químicas associadas, sobretudo antigenicidade, podem auxiliar na determinação de possíveis biomarcadores.

Conclusão

É possível concluir que a mutação A219V pode estar associada ao desenvolvimento de HAM/TSP, mas são necessárias as avaliações de outros aspectos em conjunto, como fatores genéticos do hospedeiro, a participação de outros fatores genéticos virais e avaliação funcional da proteína Tax. Ainda sobre essa mutação, apesar do suporte estatístico para IDH, não é possível fazer nenhuma inferência, visto que o número de sequências avaliadas foi muito baixo. Em relação às mutações M107V e N230H, não apresentaram suporte estatístico na relação com o perfil clínico, mas alteraram propriedades físico-químicas da proteína e por estarem localizadas em uma região importante, a análise funcional da proteína seria importante para avaliar possíveis interferências no mecanismo celular.

Referências

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012 Nov 15;3:388. doi: 10.3389/fmicb.2012.00388. PMID: 23162541; PMCID: PMC3498738.
2. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB de F, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública [Internet]*. 2005 May;21(3):926–31. doi: 10.1590/S0102-311X2005000300027
3. Dourado, I.; Alcantara, L. C.; Barreto, M. L.; da Gloria Teixeira, M.; Galvao-Castro, B. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34:527–531.
4. Pereira FM, de Almeida MDCC, Santos FLN, Carreiro RP, Regis-Silva CG, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. *Front Microbiol.* 2019 May 14;10:1002. doi: 10.3389/fmicb.2019.01002. PMID: 31156570; PMCID: PMC6528468.
5. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Dec;77(12):7415-9. doi: 10.1073/pnas.77.12.7415. PMID: 6261256; PMCID: PMC350514.
6. Bartholomew C, Cleghorn F, Charles W, Ratan P, Roberts L, Maharaj K, Jankey N, Daisley H, Hanchard B, Blattner W. HTLV-I and tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1986 Jul 12;2(8498):99-100. doi: 10.1016/s0140-6736(86)91626-0. PMID: 2873395.
7. La Grenade L, Manns A, Fletcher V, Derm D, Carberry C, Hanchard B, Maloney EM, Cranston B, Williams NP, Wilks R, Kang EC, Blattner WA. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch Dermatol.* 1998 Apr;134(4):439-44. doi: 10.1001/archderm.134.4.439. PMID: 9554295.
8. Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti AB de FC. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção?. *Rev Assoc Med Bras*

- [Internet]. 2010;56(3):340–7. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000300021>.
9. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(12):3618-22. doi: 10.1073/pnas.80.12.3618. PMID: 6304725; PMCID: PMC394101.
 10. Gallo RC. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Dec;24(4):559-65. doi: 10.1016/j.beha.2011.09.012. Epub 2011 Nov 16. PMID: 22127321.
 11. Giam CZ, Semmes OJ. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses*. 2016 Jun 16;8(6):161. doi: 10.3390/v8060161. PMID: 27322308; PMCID: PMC4926181.
 12. Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*. 2005 Apr 26;2:27. doi: 10.1186/1742-4690-2-27. PMID: 15854229; PMCID: PMC1131926.
 13. Nagai M, Osame M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J Neurovirol*. 2003 Apr;9(2):228-35. doi: 10.1080/13550280390194028. PMID: 12707853.
 14. Goncalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, Carneiro-Proietti AB. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008 Jun;7(2):98-107. doi: 10.2174/187152808785107642. PMID: 18691139.
 15. Zhi H, Yang L, Kuo YL, Ho YK, Shih HM, Giam CZ. NF- κ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog*. 2011 Apr;7(4):e1002025. doi: 10.1371/journal.ppat.1002025. Epub 2011 Apr 28. PMID: 21552325; PMCID: PMC3084201.
 16. Pise-Masison CA, de Castro-Amarante MF, Enose-Akahata Y, Buchmann RC, Fenizia C, Washington Parks R, Edwards D, Fiocchi M, Alcantara LC Jr, Bialuk I, Graham J, Walser JC, McKinnon K, Galvão-Castro B, Gessain A, Venzon D, Jacobson S, Franchini G. Co-dependence of HTLV-1 p12 and p8 functions in virus persistence. *PLoS Pathog*. 2014 Nov 6;10(11):e1004454. doi: 10.1371/journal.ppat.1004454. PMID: 25375128; PMCID: PMC4223054.

17. Borba MMN, Farre L, Bittencourt AL, Castro-Amarante MF, Galvão-Castro B, Santos LA, Araújo THA, Alcantara LCJ, Barreto FK. Assessment of Genetic Diversity of HTLV-1 ORF-I Sequences Collected from Patients with Different Clinical Profiles. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019 Sep;35(9):881-884. doi: 10.1089/AID.2019.0127. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31154802.
18. Cucco MS, de Moraes LEP, de Oliveira Andrade F, Khouri R, Galvão-Castro B, Araujo THA, de Almeida Rego FF, Gois LL, Barreto FK, Santos LA. Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hbz from patients with different clinical conditions. *J Med Virol*. 2021 Nov;93(11):6418-6423. doi: 10.1002/jmv.27005. Epub 2021 Jun 21. PMID: 33835501.
19. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998 Dec;4(6):586-93. doi: 10.3109/13550289809114225. PMID: 10065900.
20. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol*. 2001 Jun;7(3):228-34. doi: 10.1080/13550280152403272. PMID: 11517397.
21. Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Kamihira S, Yamaguchi K; Joint Study on Predisposing Factors of ATL Development investigators. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1211-9. doi: 10.1182/blood-2009-12-257410. Epub 2010 May 6. PMID: 20448111.
22. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2000 Nov;182(5):1343-9. doi: 10.1086/315897. Epub 2000 Sep 22. PMID: 11010842.
23. Barreto FK, Khouri R, Rego FFA, Santos LA, Castro-Amarante MF, Bialuk I, Pise-Masison CA, Galvão-Castro B, Gessain A, Jacobson S, Franchini G, Alcantara LC Jr.

- Analyses of HTLV-1 sequences suggest interaction between ORF-I mutations and HAM/TSP outcome. *Infect Genet Evol.* 2016 Nov;45:420-425. doi: 10.1016/j.meegid.2016.08.020. Epub 2016 Aug 21. PMID: 27553711; PMCID: PMC5123959.
24. Niewiesk S, Daenke S, Parker CE, Taylor G, Weber J, Nightingale S, Bangham CR. Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I Tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of Tax. *J Virol.* 1995 Apr;69(4):2649-53. doi: 10.1128/JVI.69.4.2649-2653.1995. PMID: 7533860; PMCID: PMC188948.
25. Semmes OJ, Jeang KT. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *J Virol.* 1992 Dec;66(12):7183-92. doi: 10.1128/JVI.66.12.7183-7192.1992. PMID: 1433511; PMCID: PMC240413.
26. Nozuma S, Matsuura E, Kodama D, Tashiro Y, Matsuzaki T, Kubota R, Izumo S, Takashima H. Effects of host restriction factors and the HTLV-1 subtype on susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology.* 2017 Apr 19;14(1):26. doi: 10.1186/s12977-017-0350-9. PMID: 28420387; PMCID: PMC5395872.
27. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001041. PMID: 8011280.
28. Kuo YL, Giam CZ. Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *EMBO J.* 2006 Apr 19;25(8):1741-52. doi: 10.1038/sj.emboj.7601054. Epub 2006 Apr 6. PMID: 16601696; PMCID: PMC1440834.
29. de Souza DRV, Pessôa R, Nukui Y, Pereira J, Marcusso RN, de Oliveira ACP, Casseb J, da Silva Duarte AJ, Clissa PB, Sanabani SS. Identification of miRNAs with possible prognostic roles for HAM/TSP. *Virulence.* 2023 Dec;14(1):2230015. doi: 10.1080/21505594.2023.2230015. PMID: 37394816; PMCID: PMC10321194.
30. Jin DY, Jeang KT. HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jan 15;25(2):379-87. doi: 10.1093/nar/25.2.379. PMID: 9016568; PMCID: PMC146437.

31. Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. *Front Microbiol.* 2019 May 8;10:999. doi: 10.3389/fmicb.2019.00999. PMID: 31134031; PMCID: PMC6517543.

Figura 1 - Fluxograma de seleção das seqüências da região *tax* do genoma do HTLV-1 incluídas no estudo. HTLV1 DB - *HTLV-1 Molecular Epidemiology Database*; ACs - assintomáticos; HAM/TSP - Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1; ATL - linfoma de células T do adulto; IDH - Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1; n = número de seqüências.

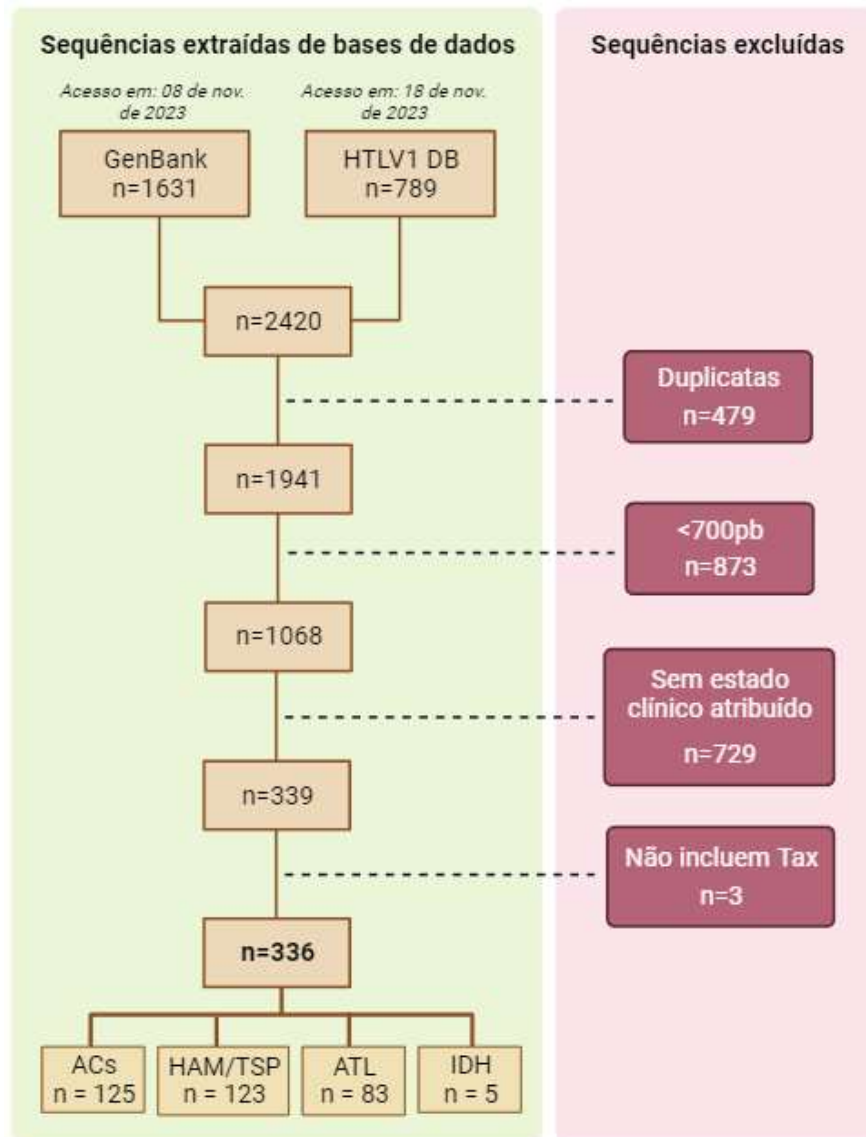
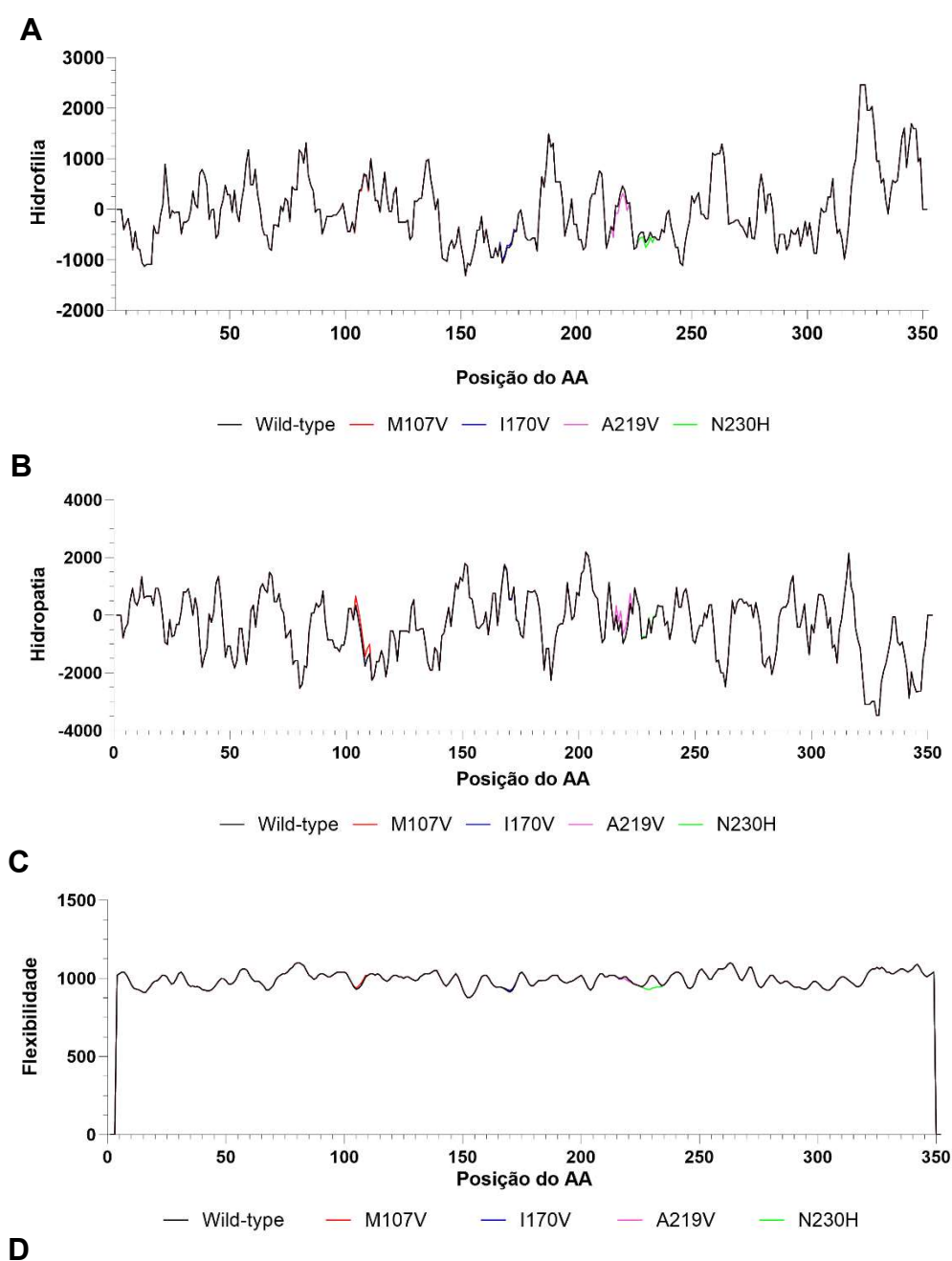


Figura 2 - Análise comparada das propriedades físico-químicas das seqüências com as mutações M107V (vermelho), I170V (azul), A219V (rosa), N230H (verde) e a seqüência selvagem (preto). (A) Hidrofilia, (B) Hidropatia, (C) Flexibilidade, (D) Antigenicidade A, (E) Antigenicidade B, (F) Acessibilidade e (G) Hélice enterrada na membrana.



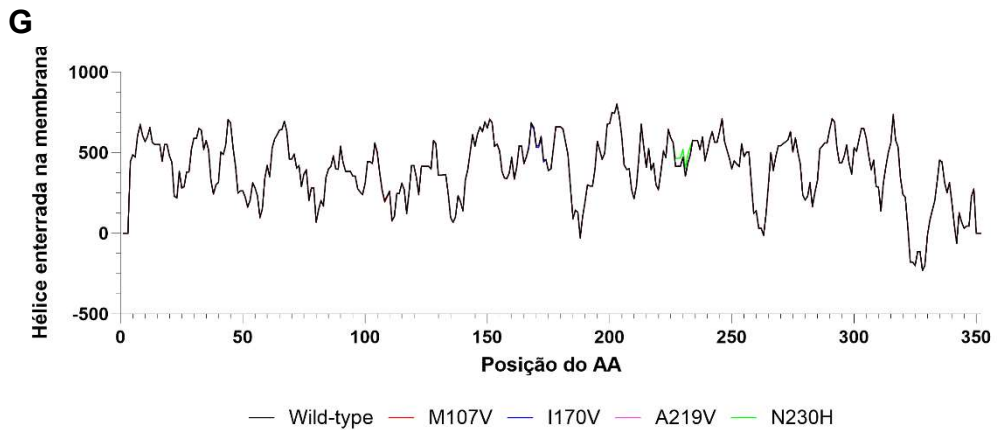
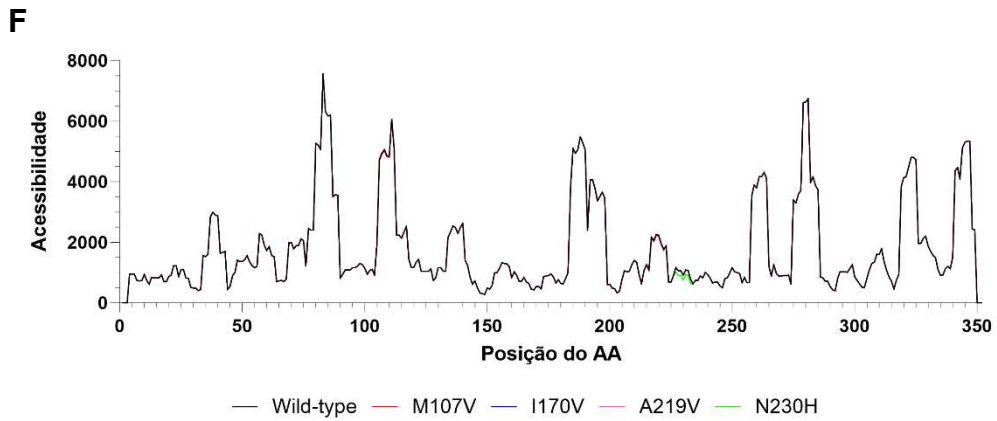
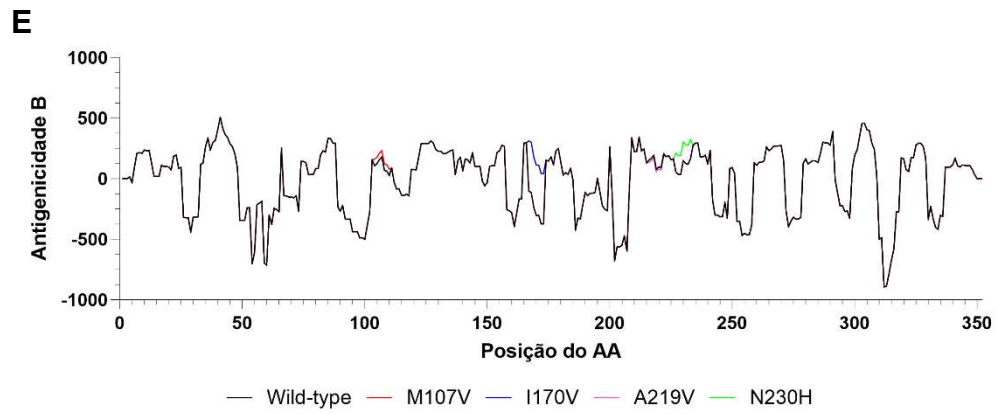
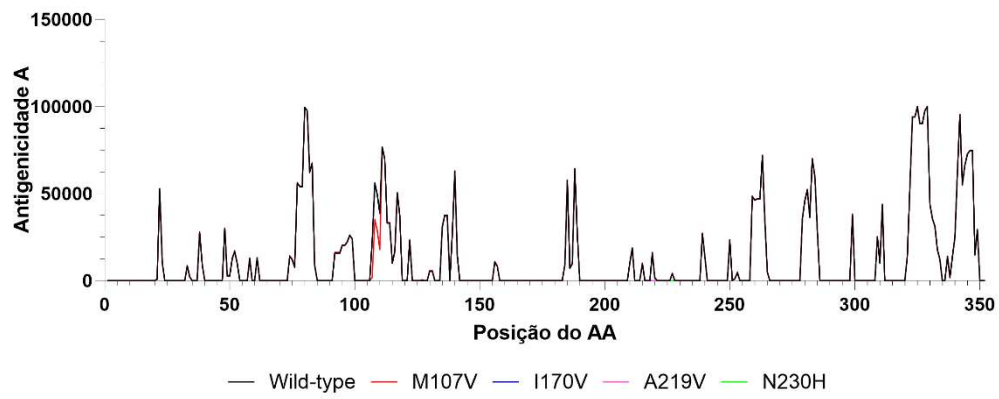


Tabela 1 - Variação das frequências das mutações em Tax e comparação das frequências entre isolados de ACs, HAM/TSP, ATL e IDH.

Posição do nucleotídeo	Variação do nucleotídeo	Variação do AA	Frequência				
			Total (n = 336)	AC (n = 125)	HAM/TSP (n = 123)	ATL (n = 83)	IDH (n = 5)
319	A → G	M107V	22/336 (6,54%)	4/125 (3,2%)	10/123 (8,13%)	8/83 (9,63%)	0/5 (0%)
508	A → G	I170V	23/336 (6,84%)	5/125 (4%)	10/123 (8,13%)	8/83 (9,63%)	0/5 (0%)
656	C → T	A219V	135/336 (40,17%)	35/125 (28%)	66/123 (53,65%)	29/83 (34,93%)	5/5 (100%)
688	A → C	N230H	22/336 (6,54%)	4/125 (3,2%)	10/123 (8,13%)	8/83 (9,63%)	0/5 (0%)

* ACs - assintomáticos; HAM/TSP - Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1; ATL - linfoma de células T do adulto; IDH - Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1; AA – aminoácido; n – número de seqüências.

Tabela 2 - Análise estática da comparação das frequências das mutações em Tax entre todos os grupos, ACs e HAM/TSP, ACs e ATL e ACs e IDH.

Posição do nucleotídeo	Variação do nucleotídeo	Variação do AA	valor de p			
			Todos os grupos	AC vs HAM/TSP	AC vs ATL	AC vs IDH
319	A → G	M107V	0,2467	0,0868	0,0784	>0,9999
508	A → G	I170V	0,3809	0,1582	0,1516	>0,9999
656	C → T	A219V	0,000004	0,000034	0,4534	0,002
688	A → C	N230H	0,2403	0,0841	0,0771	>0,9999

* Para a análise entre todos os grupos foi usado teste de chi-quadrado, e para a análise entre ACs e HAM/TSP, ACs e ATL e ACs e IDH foi usado teste exato de Fisher. Em negrito os resultados estatisticamente significativos com $p < 0,05$. ACs - assintomáticos; HAM/TSP - Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1; ATL - linfoma de células T do adulto; IDH - Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1; AA – aminoácido.

Tabela 3 - Alterações físico-químicas de acordo com a variação do aminoácido na sequência de Tax.

Varição do AA	Aumenta	Diminui
M107V	Hidropatia e antigenicidade B	Antigenicidade A
I170V	Antigenicidade B	-
A219V	Hidropatia	Hidrofilia e antigenicidade A
N230H	Hélice enterrada na membrana e antigenicidade B	Hidrofilia, flexibilidade, antigenicidade A e acessibilidade

2. Proposta de submissão

2.1 Revista: Revista de Ciências Médicas e Biológicas

2.2 Regras para Submissão:

2.2.1 Normas editoriais

2.2.1.1 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação:

- 2.2.1.1.1 Editorial – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial.
- 2.2.1.1.2 Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.
- 2.2.1.1.3 Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.
- 2.2.1.1.4 Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e idéias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.
- 2.2.1.1.5 Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.
- 2.2.1.1.6 Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.
- 2.2.1.1.7 Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.
- 2.2.1.1.8 Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

- 2.2.1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.
- 2.2.1.3 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.
- 2.2.1.4 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um Comitê de Ética e Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório. O Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP deve ser encaminhado como INSTRUMENTO DE PESQUISA no momento da submissão assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por um participante da pesquisa.
- 2.2.1.5 Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.
- 2.2.1.6 A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão dois exemplares do número da Revista em que o trabalho for publicado.

2.2.1.7 Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação.

Não existe taxa para o processo de submissão e publicação.

2.2.1.8 A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos como INSTRUMENTO DE PESQUISA: “Certifico(amos) que o artigo enviado à Revista de Ciências Médicas e Biológicas é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico”.

2.2.1.9 Submissão de artigos online

2.2.1.9.1 Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da Revista de Ciências Médicas e Biológicas disponível em <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/about/submissions> ou <http://www.cienciasmedicasbiologicas.ufba.br>. Outras formas de submissão não serão aceitas. O cadastro no processo de submissão não deve ultrapassar de 6 entre autor e co-autores inscritos.

2.2.2 Apresentação dos trabalhos

2.2.2.1 Os textos poderão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman, corpo 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado. Se o texto for em outro idioma (inglês, espanhol ou francês), após o comunicado de preliminar indicação para publicação, o mesmo deverá ser reavaliado/reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para a autorização da versão definitiva.

2.2.2.2 As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics ou outro, fornecidas em formato digital. As fotografias deverão ser fornecidas em papel ou em slides ou cromo. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte superior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (Figura 1-, Quadro 5-) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, em corpo 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.

2.2.2.3 As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex.,

Tabela 1 - Título; Tabela 2 - Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).

2.2.2.4 Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.

2.2.2.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.2.2.6 Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.2.2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em 2.2.2.7.1 a 2.2.2.7.2, **na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.2.2.7.1 Elementos pré-textuais

2.2.2.7.1.1 Cabeçalho, em que devem figurar:

2.2.2.7.1.1.1 O título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;

2.2.2.7.1.1.2 O(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) da sua titulação mais importante e vínculo empregatício (se houver), a qual será a ser inserida em nota de rodapé juntamente com o endereço profissional completo, inclusive telefone e e-mail do autor ou co-autoria, principal do trabalho.

2.2.2.7.1.2 Resumo (português) e *Abstract* (Inglês) - Apresentação concisa e estruturada dos pontos relevantes do texto, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta

na NBR - **6028/2021**, e não exceder as 250 palavras recomendadas. Se o texto for em outra língua (espanhol ou francês) observa-se o mesmo procedimento. Sendo o artigo, preliminarmente, indicado para publicação, o resumo em idioma estrangeiro deverá ser reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para fazer a versão definitiva do mesmo.

2.2.2.7.1.3 **Palavras-chave e Keywords** – palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do texto (no máximo 5), separadas por ponto e vírgula e finalizada por ponto, que constem no Descritores em Ciências de Saúde (DeCS), no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/> ou MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

2.2.2.7.2 Texto

2.2.2.7.2.1 **Introdução** – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

2.2.2.7.2.2 **Materiais e métodos** - A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).

2.2.2.7.2.3 **Resultados** – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.

2.2.2.7.2.4 Discussão – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.

2.2.2.7.2.5 Conclusão – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.2.2.7.3 Elementos pós-textuais

2.2.2.7.3.1 Referências – Devem ser elaboradas de acordo com o Padrão Vancouver (International Committee of Medical Journal Editors -ICMJE). As referências devem ser organizadas **em ordem numérico crescente** (algarismos arábicos), utilizando duas maneiras para as citações no texto o **sistema numérico sobrescrito**^{3,4,7-10} ou **alfanumérico um autor** Gatewood³¹ (2012), **dois autores** Cotti, Santos¹² (2016), **três autores** Azer, Safi, Almeida²³ (2011) e **mais que quatro autores** Silva et al.¹⁵ (2013). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com as bases e/ou Portal de revista BVS, Medline ou LILACS. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, de 20, exceto artigos de revisão já os originais não devem ultrapassar o número máximo de 35. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

2.2.2.7.3.1.1 Para artigos de periódicos: autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, data do fascículo (exs.: 2001 jan; 2005 July- Sept etc.), volume, número do fascículo, quando o fascículo citado for um Suplemento, paginação inicial e final do artigo, DOI.

- 2.2.2.7.3.1.2 Para **livros**: autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), local, editora e ano de publicação. Paginação.
 - 2.2.2.7.3.1.3 Para trabalhos acadêmicos: autor(es) e título do trabalho, seguidos do tipo da publicação. cidade de publicação, instituição, ano de publicação. página.
 - 2.2.2.7.3.1.4 Para **trabalho apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da expressão *In: numeração do evento* e nome do evento (se houver), local e responsabilidade da publicação, ano.
- 2.2.2.7.3.2 Agradecimentos (quando houver).
- 2.2.2.7.3.3 Data de entrega dos originais à redação da Revista.