



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

ALESSANDRA GONZALEZ DO NASCIMENTO

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANOIDES
PELOS LIPÍDEOS DA PAREDE CELULAR DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

SALVADOR – BA

2019

ALESSANDRA GONZALEZ DO NASCIMENTO

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANOIDES PELOS LIPÍDEOS DA PAREDE
CELULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva.
Co-orientador: Igor Müller da Silva Santos.

SALVADOR – BA

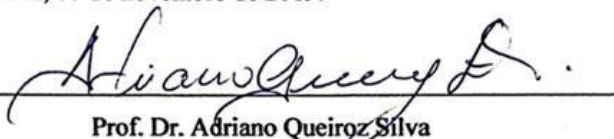
2019

ALESSANDRA GONZALEZ DO NASCIMENTO

**REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE EICOSANOIDES PELOS LIPÍDEOS DA PAREDE
CELULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

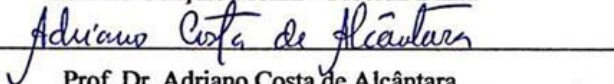
Este artigo foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 07 de novembro de 2019.



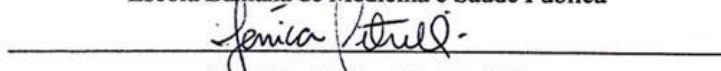
Prof. Dr. Adriano Queiroz Silva

Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia



Prof. Dr. Adriano Costa de Alcântara

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Jéssica Dias Petrilli

Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia

Dedico esse trabalho a todos aqueles que acreditam no meu potencial e que sempre souberam que eu sou capaz de enfrentar todo e qualquer desafio que a vida me traz.

Esse TCC é mais uma batalha vencida com sucesso!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roqueline Gonzalez Mendes e José Alexandre Gomes do Nascimento, que mesmo não compreendendo exatamente o tipo de pesquisa que desenvolvi, com muito amor e carinho sabem que foi importante e que significa muito para mim, e isso é mais do que o suficiente; sempre me apoiaram incondicionalmente para alcançar meus objetivos e alcançar minhas metas, nunca mediram esforços para me ajudar durante todo o tempo em que estive envolvida com a pesquisa em laboratório e com a escrita desse trabalho; obrigada por tudo, sem vocês eu nem sonharia estar aqui hoje.

Aos meus amigos da faculdade, que compartilharam meus incontáveis dramas, surtos e desesperos, mas que também que compartilharam o orgulho ao apresentarmos trabalhos excelentes, de momentos leves de descontração no meio do caos de fins de semestre e de resenhas que ficarão pra sempre nas nossas memórias; a gente sabe muito bem que cada um tem uma realidade diferente, mas pra mim, dividir um pouco da minha vida com vocês e poder ouvir sobre a vida de vocês me ajudou a passar por momentos de crise e me motivavam a ser uma pessoa melhor e assim conseguir atingir além do que me era proposto.

Aos meus amigos fora da faculdade, pela paciência com os meus sumiços, com minha demora para responder mensagens e com meus horários loucos, mesmo não convivendo todo dia com vocês, sempre que nos encontrávamos parecia que nada havia mudado e isso sempre inunda meu coração de alegria; obrigada por nunca me julgarem uma péssima amiga e se afastarem de mim por ter uma rotina nada convencional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Queiroz, que junto a Dr. Sérgio Arruda, me acolheram como estudante de iniciação científica durante um ano em seu grupo, por me permitir participar de sua linha de pesquisa com Tuberculose no qual esse projeto faz parte, por me ensinar incisivamente sobre responsabilidades e por ter proporcionado uma vivência única enquanto fui sua orientanda.

A meu co-orientador Igor Müller por sempre ter paciência comigo, por sempre se mostrar disposto a ensinar algo novo, por sempre me tirar inúmeras dúvidas e por sua dedicação ao projeto que me inspiraram, ajudaram e guiaram durante todo o período de realização do mesmo.

A todos os meus colegas do P0 do Laboratório Avançado de Saúde Pública – Fiocruz Bahia, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável e descontraído, mas, ao mesmo tempo, inspirador e motivador, sou muito feliz de ter conhecido, convivido e trabalhado com cada um de vocês.

Ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM), pela estrutura física para a realização do projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

*” Forte é aquele que ao cortarem suas asas, criou um
novo jeito de conseguir voar.”*

- Autor desconhecido

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....9

2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO22

2.1 REVISTA:22

2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO:22

1. Artigo Científico

Regulação da síntese de eicosanoides pelos lipídeos da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Alessandra Gonzalez do Nascimento^{1 2 *}; Igor Müller da Silva Santos²; Sérgio Marcos Arruda²; Adriano Queiroz Silva².

¹ Curso de Biomedicina. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, BA, Brasil.

²Laboratório Avançado de Saúde Pública. Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz Bahia). Salvador, BA, Brasil.

***Endereço para correspondência:**

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Rua Silveira Martins, nº 3386, Cabula

41150-100 - Salvador, BA – Brasil

E-mail: alessandranascimento16.1@bahiana.edu.br

Resumo

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) possui capacidade peculiar de adaptação às condições impostas pelo hospedeiro. Uma das estratégias de adaptação inclui alteração na composição de sua parede celular. O operon *mce1* possui um papel importante no transporte de lipídeos e em alterações lipídicas *mce1* dependentes, contribuindo para regulação da resposta imune durante infecções por Mtb. Porém, os mecanismos subjacentes à essa regulação e o papel das alterações na síntese de eicosanoides pelos macrófagos ainda não foram explorados. Objetiva-se avaliar a síntese de mediadores lipídicos em macrófagos estimulados pelos extratos lipídicos em cepas de Mtb selvagem (WT) e mutante ($\Delta 1$) no operon *mce1*. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com lipídeos da cepa WT e $\Delta 1$ do Mtb. A expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de mediadores lipídicos: 5-lipoxigenase, 15-lipoxigenase e ciclooxigenase-2 foi avaliada por qRT-PCR. Os mediadores PGE2 e LTB4 produzidos por macrófagos sob as mesmas condições foram quantificados em sobrenadante de cultura utilizando ELISA competitivo. Ambos extratos lipídicos induziram repressão da produção de LTB4 por macrófagos e diminuição da expressão gênica da enzima 5-LO. Em contrapartida, enquanto os lipídeos da cepa WT induziram elevada produção de PGE2 pelos macrófagos, os lipídeos da cepa $\Delta 1$ induziram redução significativa de sua produção, corroborando com os dados da expressão de COX-2. Nossos achados sugerem que a modulação da produção dessas espécies bioativas no

hospedeiro, induzida pela remodelagem lipídica da parede do Mtb durante o curso natural da infecção é um mecanismo importante pelo qual o bacilo dirige o desfecho da infecção.

Descritores: Tuberculose; Lipídeos; Mediadores Lipídicos

Abstract

Regulation of eicosanoid synthesis by *Mycobacterium tuberculosis* cell wall lipids

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) has a peculiar ability to adapt it self to conditions imposed by the host. One of the adaptation strategies includes changing the composition of cell wall. Operon *mce1* plays an important role in lipid transport and *mce1* dependent lipid changes, contributing to regulation of the immune response during Mtb infections. However, the mechanisms underlying this regulation and the role of alterations in eicosanoid synthesis by macrophages have not yet been explored. The objective of this study was to evaluate the synthesis of lipid mediators in macrophages stimulated by lipid extracts of wild (WT) and mutant ($\Delta 1$) Mtb strains in *mce1* operon. RAW 264.7 macrophages were stimulated with WT and $\Delta 1$ lipids from Mtb. The expression of genes encoding enzymes involved in the synthesis of lipid mediators: 5-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 was evaluated by qRT-PCR. PGE2 and LTB4 mediators produced by macrophages under the same conditions were quantified in culture supernatant using competitive ELISA. Both lipids extracts induced repression of LTB4 production by macrophages and decreased gene expression of 5-LO enzyme. In contrast, whereas WT strain lipids induced high PGE2 production by macrophages, $\Delta 1$ strain lipids induced significant reduction of their production, corroborating data of COX-2 expression. Our findings suggest that the modulation of production of these bioactive species in the host induced by lipid remodeling of the Mtb wall during the natural course of infection is an important mechanism by which the bacillus directs the outcome of infection.

Keywords: Tuberculosis, Lipids, Lipid Mediators

Resumen

Regulación de la síntesis de eicosanoides por los lípidos de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) tiene una capacidad peculiar de adaptarse a las condiciones impuestas por el huésped. Una de las estrategias de adaptación incluye cambiar la composición de la pared celular. Operon *mce1* juega un papel importante en el transporte de lípidos y los cambios de lípidos dependientes de *mce1*, contribuyendo a la regulación de la respuesta inmune durante las infecciones por Mtb. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a esta regulación y el papel de las alteraciones en la síntesis de eicosanoides por los macrófagos aún no se han

explorado. El objetivo de este estudio fue evaluar la síntesis de mediadores de lípidos en macrófagos estimulados por extractos de lípidos en cepas de *Mtb* salvajes (WT) y mutantes ($\Delta 1$) en el operón *mce1*. RAW 264.7 macrófagos fueron estimulados con WT y $\Delta 1$ lípidos de *Mtb*. qRT-PCR evaluó la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de mediadores lipídicos: 5-lipoxigenasa, 15-lipoxigenasa y ciclooxygenasa-2. Los mediadores de PGE2 y LTB4 producidos por macrófagos en las mismas condiciones se cuantificaron en sobrenadante de cultivo usando ELISA competitivo. Ambos extractos lipídicos indujeron la represión de la producción de LTB4 por los macrófagos y disminuyeron la expresión génica de la enzima 5-LO. En contraste, mientras que los lípidos de la cepa WT indujeron una alta producción de PGE2 por los macrófagos, los lípidos de la cepa $\Delta 1$ indujeron una reducción significativa de su producción, corroborando los datos de expresión de COX-2. Nuestros hallazgos sugieren que la modulación de la producción de estas especies bioactivas en el huésped inducida por la remodelación lipídica de la pared de *Mtb* durante el curso natural de la infección es un mecanismo importante por el cual el bacilo dirige el resultado de la infección.

Palabras chave: Tuberculosis; Lípidos; Mediadores de Lípidos

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença crônica milenar de caráter transmissível que mundialmente causou cerca de 1,3 milhão de mortes entre pessoas HIV-negativas e um adicional de 300.000 mortes entre pessoas HIV-positivas em 2017¹. De acordo com a Secretaria de Vigilância Epidemiológica, no Brasil, cerca de 75 mil novos casos e 5 mil óbitos foram identificados decorrentes da tuberculose em 2018².

O *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), agente etiológico da TB, é um bacilo álcool-ácido-resistente que possui em sua parede celular uma estrutura peculiar, com cerca de 40% do seu peso seco composto por lipídeos³. Além disso, uma parte considerável do genoma do *Mtb* é dedicado ao metabolismo lipídico⁴. Os lipídeos de *Mtb* parecem apresentar diferentes perfis de modulação da resposta imune do hospedeiro a depender do estágio de infecção, como foi proposto por Queiroz & Riley em um modelo denominado “imunostato bacteriano”, sugerindo que mudanças na composição lipídica da parede bacteriana dirigem o desfecho da infecção para o estabelecimento da tuberculose latente ou da tuberculose ativa no indivíduo⁵.

No genoma do *Mtb* há um conjunto de genes que são responsáveis pelo transporte de lipídeos, importando-os, pela parede celular. Tais genes são os transportadores ABC putativos codificados pelos operons *mce1-4*⁴. Após a descoberta do operon *mce1*⁶, Shimono e colaboradores demonstraram que a interrupção desse operon modula a resposta imune desencadeada pelo bacilo no hospedeiro, tornando o *Mtb* incapaz de induzir

uma resposta pró-inflamatória e a formação de um granuloma organizado, característico da doença⁷.

Ao avaliar a expressão do operon *mce1* durante o curso natural da infecção, Casali e colaboradores observaram que a cepa de *Mtb* selvagem após 4 horas de infecção de macrófagos do tipo RAW 264.7 apresenta repressão deste operon⁸. Adicionalmente, Uchida e colaboradores mostraram que esse desfecho também pode ser observado durante a oitava semana de infecção em camundongos, sugerindo uma semelhança fenotípica entre a cepa mutante no operon *mce1* e a cepa selvagem em uma infecção tardia⁹.

Importante ressaltar que Cantrell e colaboradores que mostraram que a cepa mutante acumula 10x mais ácidos micólicos livres que a cepa selvagem do *Mtb*¹⁰. Dunphy e colaboradores, que propuseram um envolvimento do operon *mce1* na importação de ácidos micólicos¹¹. Finalmente, Queiroz e colaboradores revelaram mais de 400 lipídeos significativamente alterados na cepa mutante em relação à cepa selvagem¹². Juntos, esses dados sugerem que o *Mtb* modula a composição de sua parede celular durante o curso da infecção, tornando-se capaz de se adaptar a situações estressantes impostas pelo hospedeiro, e estabelecer uma infecção a longo prazo.

Recentemente nosso grupo de pesquisa avaliou a expressão de marcadores inflamatórios em macrófagos estimulados com lipídeos apolares extraídos das cepas de *Mtb* selvagem (WT) e mutante no operon *mce1* ($\Delta 1$) (dados não publicados). O extrato lipídico da cepa $\Delta 1$ reduziu a produção das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α em, respectivamente, 9, 19 e 4 vezes menos em macrófagos murinos, com relação ao estímulo induzido pelo extrato lipídico da cepa WT, sugerindo que, ao reprimir a expressão do operon *mce1*, as alterações lipídicas da parede do *Mtb* induzem uma forte regulação da resposta inflamatória. Porém, os mecanismos moleculares subjacentes à essa modulação, bem como o papel de moléculas sinalizadoras bioativas, tais como os eicosanoides, nesse processo ainda não foram descritos.

Os eicosanoides são uma família de moléculas de sinalização biológica muito potentes que atuam como mensageiros de curta distância, agindo sobre os tecidos próximos às células que os produzem¹³. Mediadores como a prostaglandina e o leucotrieno estão envolvidos em processos inflamatórios e são produzidos em abundância pelas células do sistema imune¹⁴. As principais enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico são a 5-lipoxigenase (5-LO), 15-lipoxigenase (15-LO) e cicloxigenase-2 (COX-2) que desempenham papéis importantes na modulação da resposta inflamatória¹⁵. Após liberado dos glicerofosfolipídeos de membrana, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias: a via das ciclooxygenases que pode gerar os prostanoídes (prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina) ou a via das lipoxigenases (5-LO e 15-LO) originando os leucotrienos e eoxinas^{16 17 18}.

A prostaglandina E2 (PGE2), produto da COX-2, pode ser sintetizada quando as células sofrem algum tipo de lesão mecânica, em resposta a citocinas específicas, fatores de crescimento ou outros estímulos variados¹⁴. Esse mediador lipídico possui um efeito vasodilatador potente e pode culminar no aumento da permeabilidade vascular, induzido pela bradicinina e pela histamina. Em mamíferos as enzimas lipoxigenases são expressas em variados tipos celulares incluindo células epiteliais, endoteliais e do sistema imune¹⁹. O ácido araquidônico pode ser processado em eoxina pela 15-LO, que é uma análoga do 5-LO¹⁵, sendo essa uma enzima chave envolvida na síntese de Mediadores Pró-Resolução Especializados (SPMs) incluindo lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas, que facilitam a resolução da inflamação²⁰. O leucotrieno B4 (LTB4) é um dos produtos da enzima 5-LO, porém também há uma contribuição da 15-LO em seu metabolismo. O LTB4 é produzido majoritariamente por células inflamatórias¹⁴. A produção de LTB4 por macrófagos locais teciduais é responsável pela indução da migração de neutrófilos para sítios específicos inflamatórios, sendo considerado assim um potente agente quimiotático²¹. Esse mediador lipídico também age na ativação de leucócitos e aumento da fagocitose, propiciando assim a destruição dos microorganismos pelos macrófagos que foram ativados²². Sendo assim, é possível inferir que um único mediador pode contribuir para diferentes fenômenos, bem como um único fenômeno pode ser induzido por diferentes mediadores lipídicos²³, tornando o balanço na produção desses mediadores um importante fator que pode comprometer a resistência do hospedeiro à infecção.

Considerando a capacidade de adaptação do Mtb às condições encontradas no hospedeiro, e de regulação da resposta imune, é possível hipotetizar que as alterações lipídicas da parede do Mtb modulam a síntese de mediadores lipídicos nos macrófagos. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar esse processo em macrófagos estimulados pelos extratos lipídicos das cepas de Mtb selvagem e mutante no operon *mce1*.

Materiais e Métodos

Cultivo de Macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos murinos de linhagem RAW (ATCC® TIB-71™) foram cultivados em meio de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 3.7 g/L de Bicarbonato de Sódio (Vetec) e 1% de antimicótico (Gibco)

Análise de expressão gênica

Estimulação de RAW 264.7 por lipídeos do Mtb: Um total de $3,7 \times 10^5$ macrófagos (ATCC® TIB-71™) foram cultivadas em placas de cultura previamente sensibilizadas com 0,01mg do extrato apolar de lipídeos da cepa WT e $\Delta 1$ do Mtb (doados por um pesquisador da Universidade da Califórnia, Berkeley). As células foram incubadas à 37°C e 5% de CO₂ durante um período de 72 horas.

Isolamento do RNA de RAW 264.7: O RNA das células estimuladas foi extraído com o reagente Trizol (Life technologies) e isolado com o Mini Kit RNeasy® (Quiagen), ambos de acordo com as instruções do fabricante.

Síntese de cDNA de RAW264.7: O cDNA foi sintetizado por transcriptase reversa, usando a Superscript III com os iniciadores Oligo-dT (Life Technologies) e Random Hexamers. Após sintetizado, o cDNA foi diluído em água RNase/DNase free, na concentração 1:5.

Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real: Os transcritos quantificados por qPCR foram baseados na incorporação do SYBR Green no sistema de detecção 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®). A expressão dos genes alvos foi normalizada pela média da expressão dos genes de referência *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e β -actin. Foram avaliados genes que codificam enzimas envolvidas na produção de mediadores lipídicos: 5-LO, 15-LO e COX2. Primers utilizados 5-LO de acordo com Yamashita e colaboradores²⁴: 5-LO Forward CTCCAACCTATGCGGGC, 5-LO Reverse CTTGCGGAATCGGATCA; Primers utilizados 15-LO de acordo com McDuffie e colaboradores²⁵: 15-LO Forward CTCTCAAGGCCTGTTCAGGA, 15-LO Reverse GTCCATTGTCCCCAGAACCT; Primers utilizados COX-2 de acordo com Kumar e colaboradores²⁶: COX-2 Forward CAGGT-CATTGGTGGAGAGGTG, COX-2 Reverse TGCTCATCACCCCACTCAGG

Quantificação de PGE2 e LTB4

Os mediadores lipídicos PGE2 e LTB4 foram quantificados em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados por lipídeos das cepas WT e $\Delta 1$ de Mtb e não estimulados, utilizando os Kits Prostaglandina E2 ELISA-monoclonal (Item No. 514010, Cayman Chemical Company, Estados Unidos) e Leucotrieno B4 ELISA (Item No. 520111, Cayman Chemical Company, Estados Unidos) conforme recomendações do fabricante. Após a leitura das placas, os valores de densidade óptica foram convertidos em picogramas por meio de uma ferramenta de análise de dados disponibilizada pelo fabricante.

Análise estatística

Os níveis de expressão dos genes determinados a partir dos valores de $\Delta\Delta CT$ e os dados da quantificação de mediadores lipídicos por ELISA, ambos obtidos em seis experimentos independentes em duplicata, foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). As variáveis foram expressas na forma de mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Para verificação da distribuição de normalidade das variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste Mann Whitney para comparar a mediana entre os grupos de células estimuladas por lipídeos da cepa WT e da cepa $\Delta 1$ do Mtb. Diferenças com valor de P menor ou igual que 0.05 foram consideradas estatisticamente significantes.

Resultados

Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de eicosanoides

Para avaliar a produção de enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides em macrófagos estimulados com o extrato lipídico das cepas WT e Δ1, realizamos uma análise da expressão relativa dos genes que codificam a produção das enzimas *5-lipoxigenase*, *15-lipoxigenase* e *cicloxygenase-2* por qRT-PCR (Figura 1).

Nossos resultados apontam uma diferença significativa ($P < 0.01$) na expressão de 5-LO entre macrófagos estimulados com lipídeos da cepa WT e da cepa Δ1, sendo registrada uma modulação do nível de expressão desse gene por parte dos lipídeos da cepa Δ1 (Figura 1A), porém, em ambos, os valores ficaram abaixo da linha tracejada, representando a repressão da expressão normal desse gene. O gene que codifica a enzima 15-LO não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à sua produção entre macrófagos estimulados com lipídeos das cepas WT e Δ1 (Figura 1B); o nível de expressão dessa enzima não é modulado pelos lipídeos do Mtb. Em contrapartida, os lipídeos da cepa Δ1 consideravelmente modularam negativamente a expressão do gene COX-2 quando comparado à cepa WT ($P < 0.01$) (Figura 1C).

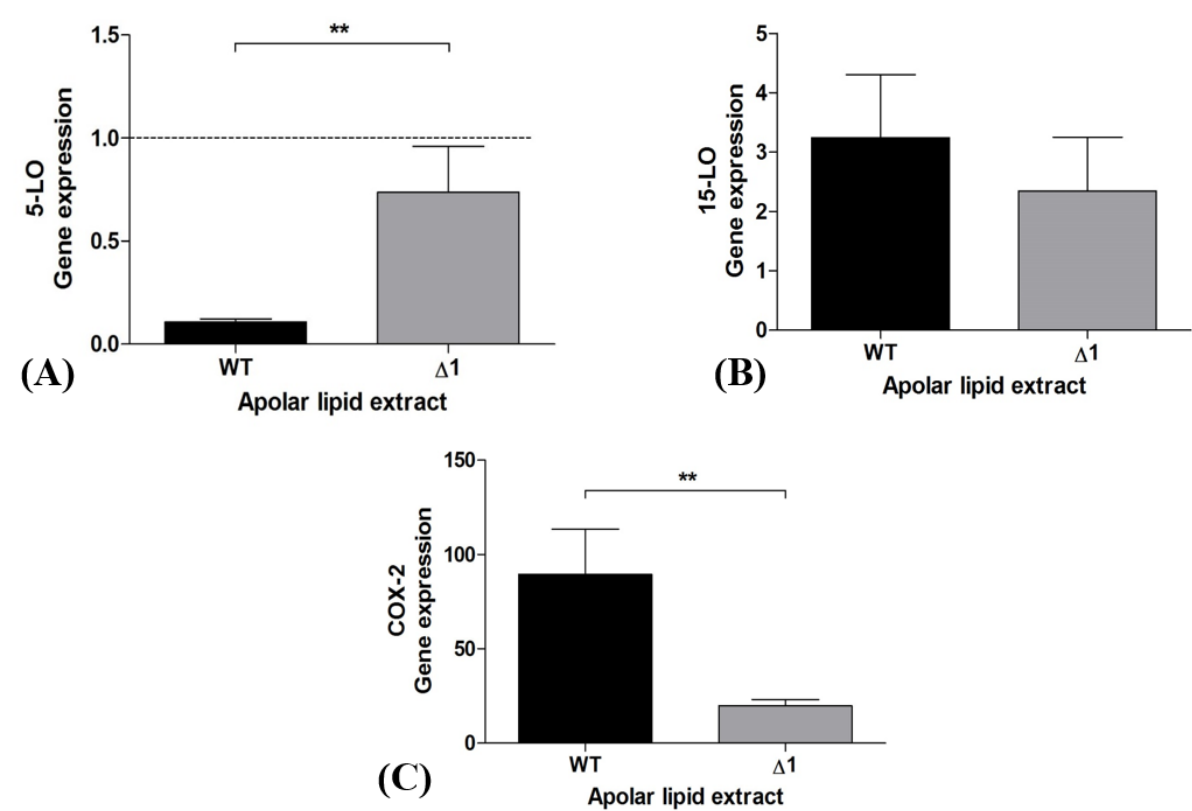


Figura 1 – Expressão gênica relativa das enzimas *5-lipoxigenase* (A), *15-lipoxigenase* (B) e *cicloxygenase-2* (C) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por 72h com lipídeos das cepas selvagem (WT) e com interrupção do operon *mce1* (Δ1) do Mtb. Valores de Ct normalizados

pela média entre os genes *gapdh* e *β-actina*. Significância foi atribuída como **P* < 0.05 e ***P* < 0.01.

Produção de eicosanoides no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados por lipídios do Mtb

Adicionalmente, para avaliar a concentração dos produtos das enzimas 5-LO e COX-2 no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com o extrato lipídico das cepas WT e Δ1, realizamos um ensaio de quantificação de leucotrieno B4 (LTB4) e prostaglandina E2 (PGE2) utilizando um ensaio imunoenzimático (Figura 2).

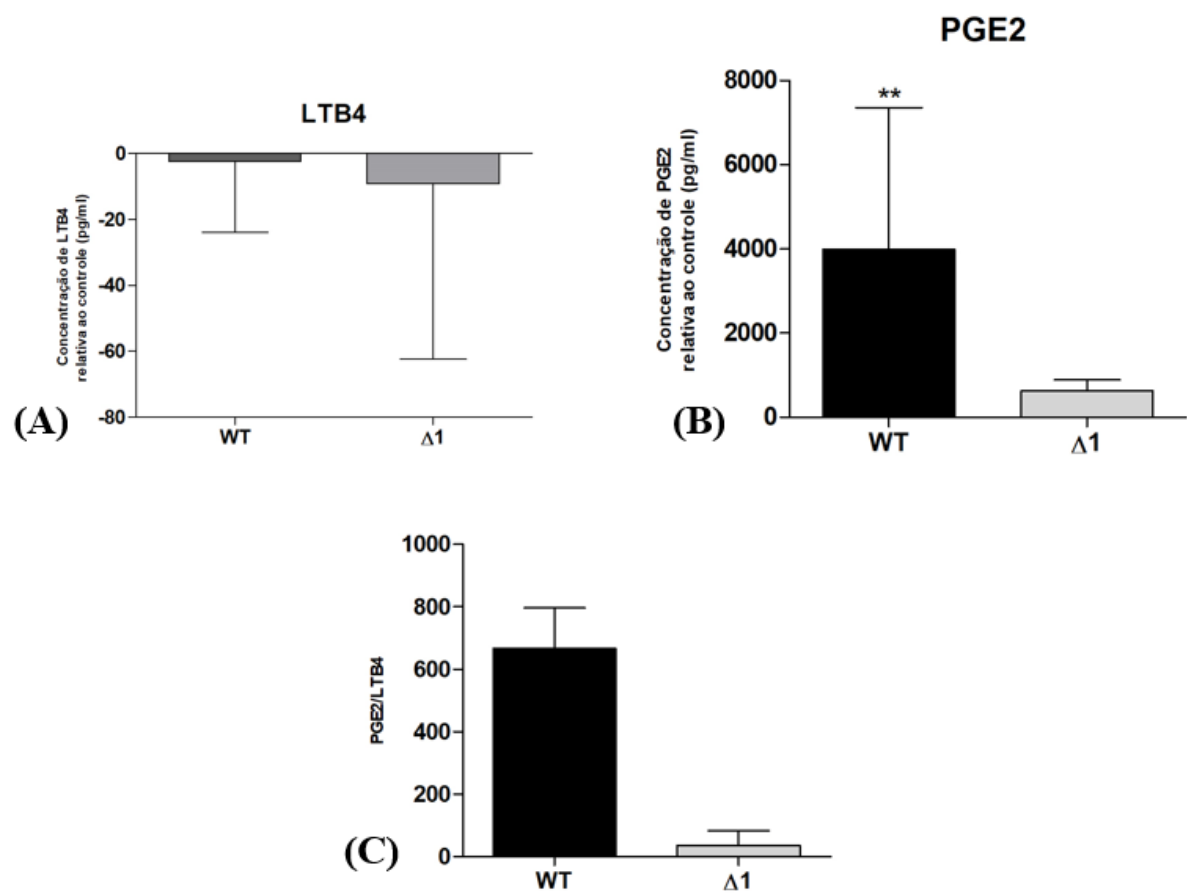


Figura 2 – Quantificação relativa de mediadores lipídicos leucotrieno B4 (A) e prostaglandina E2 (B) e a razão entre eles (C) mensurada em sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por 72h com lipídeos das cepas selvagem (WT) e com interrupção do operon *mce1* (Δ1) do Mtb. Quantificação realizada por ELISA de competição. Significância foi atribuída como **P* < 0.05 e ***P* < 0.01.

Nossos resultados revelaram que houve produção reduzida de LTB4 em células estimuladas por ambos extratos lipídicos (Figura 2A). Em contrapartida, nossos resultados mostraram alta produção de PGE2 em células estimuladas pelos lipídeos da cepa WT e uma regulação

significativa da produção desse mediador em células estimuladas por lipídeos da cepa $\Delta 1$ (Figura 2B), corroborando com a regulação da expressão da enzima COX-2 observada após estímulo com lipídeos da cepa $\Delta 1$ (Figuras 1C).

Ao analisar o balanço na produção desses mediadores por meio da razão entre os níveis de produção relativa de PGE2 e LTB4, os resultados apontaram para uma razão consideravelmente alta nas células estimuladas com os lipídeos da cepa WT, representando um desbalanço entre os níveis de PGE2 e LTB4 nas células sob estas condições. Em contrapartida, após estímulo pelos lipídeos da cepa $\Delta 1$ a razão entre os níveis de produção relativa dos mediadores apresenta-se reduzida, pois a produção de LTB4 e PGE2 foi similarmente modulada por esse extrato lipídico (Figura 2C).

Discussão

É característico do Mtb uma diversidade lipídica em sua parede celular. Análises recentes evidenciaram que tais lipídeos têm o potencial de modular respostas imunes do hospedeiro pela regulação da produção de citocinas (dados não publicados), porém o papel das alterações lipídicas *mce1* dependentes na regulação da produção de eicosanoides pelos macrófagos ainda não havia sido explorado.

Para que a síntese de eicosanoides ocorra, é necessário a disponibilização do ácido araquidônico presente na parede celular, permitindo que enzimas como lipoxigenases e cicloxigenases realizem alterações químicas em sua estrutura. De acordo com nossos resultados, a repressão da produção de LTB4 por macrófagos estimulados por ambos extratos lipídicos é acompanhada da diminuição da expressão gênica da enzima 5-LO em macrófagos sob as mesmas condições (Figura 1A e Figura 2A).

O LTB4 é reconhecido por seus efeitos pró-inflamatórios²⁷, tais como: indução de espécies reativa de oxigênio, potencialização da quimiotaxia e ativação e adesão de leucócitos no endotélio²⁸. Ao constatar uma forte modulação na produção desse leucotrieno em células estimuladas com ambos os extratos lipídicos de Mtb, é possível inferir que essa via metabólica de produção de mediadores é intrinsecamente regulada por lipídeos de Mtb independentemente do estágio de infecção. Nossos resultados de expressão gênica de 5-LO e de produção de LTB4 apontam para um possível mecanismo de evasão da resposta imune e persistência no hospedeiro pelo Mtb através da composição lipídica de sua parede celular.

A PGE2 já foi descrita por conferir resistência ao patógeno e proteção ao hospedeiro em casos de infecção por Mtb pois inibe a morte celular necrótica em macrófagos^{29 30}. Tal efeito pode estar associado à inibição da resposta IFN tipo I³¹. O produto da COX-2, a PGE2 é um potente vasodilatador e induz a expressão da citocina inflamatória IL-1 β ²² que por sua vez tem sido descrita por conferir resistência ao hospedeiro através da indução da produção de PGE2 e

promoção da completa eliminação do bacilo³¹. IL-1 β também tem um papel crucial na resposta inflamatória, sendo capaz de induzir diferenciação e proliferação celular e até mesmo apoptose³².

Inflamações pulmonares exacerbadas são reconhecidas por induzir síntese de IL-1 β ³³ e PGE2³⁴ e redução ou ausência de produtos da 5-LO, corroborando com os achados desse trabalho que apontam para uma alta produção de PGE2 e a inibição da produção basal de LTB4 pelos macrófagos, decorrentes da composição lipídica da parede do Mtb.

Os lipídeos da cepa mutante representam um estágio mais tardio de infecção por Mtb⁹ e de acordo com os nossos resultados a alteração da parede lipídica dessa bactéria proporciona uma regulação negativa na produção de COX-2 e consequentemente na síntese de PGE2. Considerando que a PGE2 tem um papel fundamental na indução da produção de IL-1 β e no processo inflamatório e que a modulação da produção de IL-1 β /PGE2 estão relacionados ao aumento da carga bacteriana e persistência da infecção, os dados de produção de PGE2 aqui apresentados corroboram com os resultados de modulação da resposta inflamatória encontrados pelo nosso grupo onde mostram que alterações na composição lipídica da parede celular de Mtb, reguladas pelo operon *mce1*, são capazes de reduzir a produção de IL-1 β (dados não publicados) e sugerem um mecanismo pelo qual o Mtb controla a resposta inflamatória do hospedeiro favorecendo assim a persistência da infecção.

Conclusão

Considerando achados anteriores do nosso grupo de que os lipídeos do Mtb regulam a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-1 β (dados não publicados), e os resultados desse trabalho que mostram seu papel na regulação da produção de eicosanoides, esses dados sugerem que a modulação da produção dessas espécies bioativas no hospedeiro, induzida pela remodelagem lipídica da parede do Mtb durante o curso natural da infecção é um mecanismo importante pelo qual o bacilo dirige o desfecho da infecção.

Agradecimentos

Nós agradecemos a todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desse trabalho. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências

1. World Health Organization [homepage da internet], Global tuberculosis report 2019 [Acesso em: 4mar. 2019]. Disponível em: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

2. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage da internet], Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença [Acesso em: 4mar. 2019]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/imagens/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf>.
3. Anderson P F. Minimal Tuberculosis. *J Natl Med Assoc.* 1940;XXXII(1):3–6.
4. Cole S T, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S V, Eiglmeier K, Gas S, Barry III C E, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, S W & B G B. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;396:537–44.
5. Queiroz A, Riley L W. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(1):9–18.
6. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley L W. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* (80-). 1993;261(5127):1454–7.
7. Shimonio N, Morici L, Casali N, Cantrell S, Sidders B, Ehrt S and Riley L W. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *PNAS [Internet]*. 2003;100(26):15918–23. Available from: <http://www.pnas.org/content/100/26/15918.full>
8. Casali N, White A M, Riley L W. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* Operon. *J Bacteriol.* 2006;188(2):441–9.
9. Uchida Y, Casali N, White A, Morici L, Kendall L V., Riley L W. Accelerated immunopathological response of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce1* operon negative transcriptional regulator. *Cell Microbiol.* 2007;9(5):1275–83.
10. Cantrell S A, Leavell M D, Marjanovic O, Iavarone A T, Leary J A, Riley L W. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the *mce1* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol.* 2013;51(5):619–26.
11. Dunphy K Y, Senaratne R H, Masuzawa M, Kendall L V, Riley L W. Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* Functionally Disrupted in a Fatty Acyl–Coenzyme A Synthetase Gene *fadD5* . *J Infect Dis.* 2010;201(8):1232–9.
12. Queiroz A, Medina-cleghorn D, Marjanovic O, Nomura D K, Riley L W. Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. *FEMS Pathog Dis.* 2015;73(August):1–9.
13. Lehninger, A L.; Nelson, D L.; Cox, M M. *Princípios de Bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. Pg 845.

14. Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* (80-). 2001;294(5548):1871–5.
15. Bozza P T, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier R A, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2011;85(5):205–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020>
16. Ferreira, S H., and Vane J. Prostaglandins: Their Disappearance from and Release into the Circulation. *Nature*. 1967;216:868–73.
17. Samuelsson B. Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* (80-). 1983;220:568–75.
18. Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M and Hammarström S (1975). Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 669–695.
19. Kuhn H, Banthiya S, Leyen K Van. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):308–30.
20. Buckley, C D., Gilroy, D W., and Serhan, C N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 2015;40(3):315–27.
21. Oliveira S H P, Canetti C, Ribeiro R A, Cunha F Q. Neutrophil Migration Induced by IL-1b Depends upon LTB4 Released by Macrophages and upon TNF-a and IL-1b Released by Mast Cells. *Inflammation*. 2008;31(1):36–46.
22. Zoccal K F, Sorgi C A, Hori J I, Paula-Silva F W G, Arantes E C, Serezani C H, et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat Commun*. 2016;7.
23. Garcia-Leme J. Hormones and inflammation. Boca Raton; CRC Press; 1988
24. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M, et al. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):1045–51.
25. Marcia McDuffie, Nelly A. Maybee, Susanna R. Keller, Brian K. Stevens, James C. Garmey, Margaret A. Morris, Elizabeth Kropf, Claudia Rival, Kaiwen Ma, Jeffrey D. Carter, Sarah A. Tersey, Craig S. Nunemaker and JLN. Nonobese Diabetic (NOD) Mice Congenic for a Targeted Deletion of 12/15-Lipoxygenase Are Protected From Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 2010;57(June 2007):199–208.
26. Kumar R, Clerc AC, Gori I, Russell R, Pellegrini C, Govender L, et al. Lipoxin A4 prevents the progression of de novo and established endometriosis in a mouse model by attenuating prostaglandin E2 production and estrogen signaling. *PLoS One*. 2014;9(2).
27. Samuelsson B, Dahlen S, Lindgren J A N A, Rouzer C A, Serhan C N. Leukotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis, and Biological Effects. *Science* (80-). 1987;237:1171–6.

28. Cotran, R. S., Kumar, V., & Collins, T. (1999). Robbins Pathologic Basis of Disease (6th ed.). Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.
29. Mayer-Barber K D and Sher A. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunol Rev.* 2016;264(1):264–75.
30. Tobin D M, Jr J C V, Ray J P, Walsh G S, Sarah J, Bang N D, et al. The *Ita4h* Locus Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection in Zebrafish and Humans. *Cell.* 2011;140(5):717–30.
31. Mayer-Barber K D, Andrade B B, Oland S D, Amaral E P, Barber D L, Gonzales J, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon cross-talk. *Nature* [Internet]. 2014;511(7507):99–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13489>
32. NCBI Gene [homepage da internet]. IL1B interleukin 1 beta [Homo sapiens (human)] [Acesso em: 20out. 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3553>
33. Medeiros A I, Sa A, Soares E G, Peres C M, Silva L, Faccioli H. Blockade of Endogenous Leukotrienes Exacerbates Pulmonary Histoplasmosis. *Infect Immun.* 2004;72(3):1637–44.
34. Byrum B R S, Goulet J L, Griffiths R J, Koller B H. Role of the 5-Lipoxygenase-activating Protein (FLAP) in Murine Acute Inflammatory Responses. *J Exp Med.* 1997;185(6):1065–75.

2. Proposta de submissão

2.1 Revista:

Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences

2.2 Regras para Submissão:

Instruções aos Autores

Submissão de artigos - Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences

O **Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences (BJHBS)**, inicialmente denominado Revista HUPE, publica artigos inéditos sobre temas diversos em todas as áreas relacionadas às ciências da saúde e biomédicas, e que não estejam simultaneamente em avaliação em nenhum outro periódico. Este jornal rejeita prontamente as práticas de plágio e autoplágio. É composto de seções dedicadas a estudos originais, revisões, estudos de caso e cartas ao editor. Os textos são aceitos em um dos três idiomas: português, inglês e espanhol. O processo de submissão de manuscritos deve considerar as seguintes orientações:

Avaliação por pares: os manuscritos são revisados por pelo menos dois especialistas no assunto. Aqueles que forem aceitos serão editados de acordo com o padrão editorial do BJHBS, com o objetivo de melhorar a clareza e eliminar possíveis redundâncias, sem, contudo, alterar o sentido original. A versão final editada será submetida aos autores para aprovação.

Termo de transferência de direitos autorais/conflitos de interesses: após o aceite final do artigo para publicação, os autores deverão enviar o termo de transferência dos direitos assinados pelo autor principal representando cada um dos autores. Neste termo deverão ser declarados quaisquer conflitos de interesses.

Carta de apresentação: uma carta que deverá acompanhar obrigatoriamente o artigo submetido, contendo, pelo menos, as seguintes informações:

- uma declaração de que o manuscrito não foi submetido para publicação em outro periódico;
- recomendação de dois consultores qualificados que sejam especialistas na área científica do artigo submetido (informando e-mail e afiliação). O Conselho Editorial poderá escolher algum destes consultores ou não;
- declaração sobre conflitos de interesse: informar se os autores possuem ou não algum conflito de interesse. Conflitos de interesse são aqueles com potencial de influenciar o conteúdo da publicação de forma a impedir a objetividade, integridade ou percepção do valor da publicação;
- declaração sobre autoria: fornecer o nome completo e as afiliações de todos os autores e o endereço de contato do autor para correspondência (endereço, endereço de *e-mail*). Os autores são ainda solicitados a declarar objetivamente que o manuscrito submetido

representa um material original, além de informar que ele não foi publicado anteriormente e que não está sendo avaliado para publicação em nenhum outro lugar.

Se os autores receberam ajuda de escritores técnicos ou revisores de idiomas quando prepararam o manuscrito, isto deve ser explicitado na carta de apresentação, junto com a declaração de que os autores são totalmente responsáveis pelo conteúdo científico do manuscrito.

Informação da autoria: o mérito da autoria científica deve ser limitado aos participantes que contribuíram intelectualmente no trabalho, além de uma colaboração efetiva para a realização da pesquisa. Portanto, para ser considerado um autor, cada colaborador deve, no mínimo, preencher as seguintes condições: (a) ter contribuído significativamente na concepção e desenho do estudo, ou na análise e interpretação dos dados; (b) ter contribuído substancialmente na elaboração do artigo, ou revisado criticamente o seu conteúdo intelectual e (c) ter aprovado sua versão final a ser publicada. A supervisão/coordenação geral do grupo de pesquisa por si só não justifica a autoria. A contribuição somente na aquisição de verbas provenientes de fontes financiadoras ou na coleta de dados também não é suficiente para justificar autoria. A fim de garantir a transparência dessas informações, os autores são solicitados a incluir uma declaração a respeito da autoria, descrevendo o papel dos autores no estudo e na preparação do manuscrito. A falta desta declaração sobre autoria na carta de apresentação implicará na desconsideração do artigo para avaliação.

A carta deverá ser assinada pelo autor principal, que representará os demais autores neste documento.

Página de título: esta página deverá conter as informações de título, autores, conforme segue:

- título (em português, inglês e espanhol) com até 100 caracteres com espaço;
- título abreviado (em português, inglês e espanhol) com até 50 caracteres com espaço;
- nome de cada autor com a respectiva afiliação, nesta ordem: prenome, nomes intermediários abreviados, último sobrenome. Departamento (ou serviço). Faculdade. Universidade (ou instituição). Cidade, UF, país.
- dados de contato do autor correspondente: prenome, nomes intermediários abreviados, último sobrenome, endereço de correspondência, *e-mail*.

Tipos de artigos

1. Artigos originais:

Artigos que resultam de pesquisas originais. São limitados a 5.000 palavras (excluindo resumo e referências) e um máximo de cinco figuras ou tabelas. A lista de referências é limitada a 40 itens. Devem ser apresentados no seguinte formato:

- **resumo:** deve ser apresentado em português, inglês e espanhol, limitado a 250 palavras. Deve seguir o modelo de resumo estruturado, contendo, obrigatoriamente: introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados e conclusões. Sabe-se que o resumo alcança

maior visibilidade e distribuição do que o artigo em si, por isto deve conter as informações essenciais do artigo, mas não deve ser uma simples composição de frases copiadas do texto integral. Deve ser sucinto e objetivo, destacando o que há de mais importante no texto, com o objetivo de atrair o leitor para a leitura integral. Ao final, a conclusão deve constar a relação dos resultados obtidos com os objetivos estabelecidos para o estudo. Adicionalmente, faz-se necessário apontar as contribuições desses resultados para o conhecimento acerca do tema pesquisado.

- **descritores:** devem ser apresentados três a seis termos referentes ao tema apresentado, separados por ponto e vírgula, conforme os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), para os idiomas português e espanhol, ou o Medical Subject Headings (MeSh) para o idioma inglês.

Texto do artigo:

- **introdução:** deve ser curta e conter o propósito (contexto e justificativa) do estudo, incluindo um breve resumo dos estudos relevantes sobre o assunto em questão, citando seus avanços mais recentes, citando apenas as referências pertinentes.
- **materiais e métodos:** esta seção deve constar, resumidamente, as informações que permitam que o estudo seja replicado por outros pesquisadores. Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com as respectivas definições sempre que necessário, além da descrição da hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade, e conter também informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos. Métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada por comitê de ética.
- **resultados:** essa seção deve ser um relato conciso da nova informação descoberta, com o mínimo de julgamento pessoal. Devem ser apresentados numa sequência lógica, iniciando pela descrição dos dados mais importantes. Não se deve repetir nos textos os dados de tabelas e ilustrações, mas apresentá-los resumidamente.
- **conclusões:** deve relatar a significância da nova informação e a relevância das novas descobertas em comparação com a literatura científica e as teorias existentes. Nesta seção devem ser mencionadas as limitações do trabalho e também suas implicações para pesquisas futuras. Por fim, as conclusões devem fazer parte da finalização, relacionando com os objetivos apontados na introdução.

- **agradecimentos:** devem ser registrados de forma concisa e limitados àquelas pessoas e/ou instituições que contribuíram para a pesquisa de alguma forma, mas não puderam ser incluídos como coautores.
- **citações no texto:** o BJHBS adota o estilo Vancouver, seguindo as normas gerais dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/). Para citações no texto, use numerais arábicos sobrescritos,¹ sem espaço, logo após a palavra e após pontuação se houver: "A descrição da doença de Parkinson¹ remete aos idos de 1950,2 quando...". Em alguns casos, os nomes dos autores podem aparecer no texto: "Phillips¹² avaliou diversos quadros de...", e devem ser citados no texto até dois autores: "Handel e Matias¹⁵ fizeram um estudo sobre...". Porém, quando o número de autores for três ou mais, deve-se citar o primeiro autor acrescido da expressão "e colaboradores": "Silveira e colaboradores¹³ propuseram uma nova metodologia...".
- **referências:** todas as referências citadas no texto deverão compor a lista de referências. As referências devem seguir o estilo Vancouver, seguindo as normas gerais dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/). Além disso, devem ser restritas a material publicado, artigos ou resumos. Os autores são responsáveis por preencher as referências de modo preciso e completo. Para referências com mais de um autor, deve-se listar até três autores por extenso, acima disso, deve-se listar os três primeiros autores seguidos de ", et al.". O total de referências não deve exceder 40.
- **tabelas e/ou figuras:** deverão somar no máximo cinco.
- **tabela:** deve ser elaborada com programas apropriados, tais como o Excel, podem ter a largura proporcional à largura de uma página diagramada, considerando fonte Arial de tamanho 9, espaçamento simples. Devem ser submetidas em arquivo de texto: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). Numeradas em ordem crescente e acompanhadas de título e/ou legenda explicativa, com uma referência objetiva no texto. Em nenhuma situação o conteúdo de uma tabela deverá replicar o de uma figura ou vice-versa. Devem ser numeradas em ordem crescente com números arábicos, em conforme o aparecimento no texto.
- **figuras:** podem ser fotos, ilustrações, gráficos, desenhos etc. Devem ser enviadas em arquivos separados (formato *.tiff ou JPEG). Devem ser numeradas em ordem crescente com números arábicos, conforme o aparecimento no texto.

ANEXO

Anexo A – Carta de Apresentação

Alessandra Gonzalez do Nascimento (alessandranascimento16.1@bahiana.edu.br)
Rua Silveira Martins, nº 3386, Cabula /CEP: 41150-100
tel.: (71) 99603-8989

Salvador, 09/11/2019

Prezado editor científico,

Através desta carta, gostaria de submeter à Brazilian Journal of Biomedical Sciences o manuscrito intitulado “Regulação da síntese de eicosanoides pelos lipídeos da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*”. Declaro que este manuscrito não foi submetido para publicação em outro periódico, não houve nenhum tipo de conflito de interesse que impactasse no valor da publicação e que este manuscrito é original e está em conformidade com as normas da revista, caso o artigo não respeite estritamente as essas normas de citação e referenciação bibliográfica, o mesmo será devolvido, sem ser iniciado o processo de revisão pelos pares.

Atenciosamente,

Alessandra Gonzalez do Nascimento.