



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

INGRID RAMALHO ALVES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG-2 NA MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*
*INFANTUM***

SALVADOR - BA

2022

INGRID RAMALHO ALVES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG-2 NA MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA*
*INFANTUM***

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(a): Prof(a). Dra. Juliana
Perrone Bezerra de Menezes Fullam

SALVADOR - BA

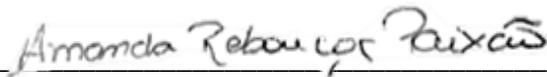
2022

INGRID RAMALHO ALVES

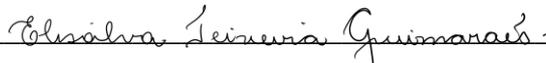
**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO LPG-2 NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *LEISHMANIA INFANTUM***

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 2022.



Me. Amanda Rebouças Paixão
Instituto Gonçalo Muniz – Fiocruz-BA



Prof(a). Dra. Elisalva Teixeira Guimarães
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Carlos Eduardo Sampaio Guedes
Universidade Federal da Bahia - UFBA

AGRADECIMENTOS

A minha vó, Joanez Barbosa, obrigada por toda educação, amor e aprendizado, sei que daria tudo para ver este dia, te amarei para sempre; A minha família, meus pais e meu irmão, por todo amor e apoio durante o caminho, nunca será fácil e ter vocês realmente muda meus dias; Aos meus amigos, meu amores por escolha, aos que cresceram comigo e aos que fui conhecendo ao longo da graduação, obrigada pela força, incentivo e paciência; A minha orientadora, Dra. Juliana Menezes, pelo compromisso e dedicação á minha formação científica, sua paixão pela ciência encanta. A minha coorientadora, Me. Amanda Rebouças, pelo seu carinho e cuidado no ensino; Aos colegas e amigos do LAIPHE-Fiocruz, por tantos aprendizados e momentos únicos. Com muito carinho, dedico este trabalho a vocês.

RESUMO

Introdução: A *Leishmania* é um parasito intracelular capaz de causar lesão na pele, mucosa e órgãos internos. A disseminação e homing de células infectadas contendo antígenos do parasito são fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Pouco se conhece sobre a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* bem como mecanismos associados a este processo. **Objetivo:** Avaliar o papel do LPG-2 (do inglês lipophosphoglycan glyconjugate 2), na migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum*. **Metódos:** Avaliamos a migração, a formação de complexos de adesão e a dinâmica de actina nas células dendríticas humanas infectadas por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene LPG-2 ou addback, utilizando o sistema Transwell e a microscopia de fluorescência. **Resultados:** As células infectadas por *L. infantum* nocaute para o LPG-2 apresentaram uma redução da migração, formação de complexos de adesão e da dinâmica de actina em relação aos outros grupos. **Discussão:** Em trabalho realizado anteriormente foi demonstrado que a infecção por *L. infantum* leva a um aumento na migração de células dendríticas, associada ao aumento da expressão de proteínas envolvidas em formação de complexos de adesão, assim como sua fosforilação. Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e enfermidade é particularmente estreita. Estudos para melhor entender o processo de adesão e migração celular e sua relação com a sobrevivência intracelular do parasito e disseminação da doença são fundamentais. **Considerações finais:** O LPG-2 apresenta um papel importante na modulação da migração das células dendríticas humanas infectadas por *Leishmania infantum*.

Palavras-chave: Célula dendrítica; *Leishmania*; Migração; LPG

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	7
Elementos pré-textuais.....	7
Introdução.....	8
Materiais e métodos.....	10
Resultados.....	12
Discussão.....	19
Conclusão.....	22
Referências.....	22
2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO.....	28
Revista.....	28
Normas editoriais.....	28

1 ARTIGO CIENTÍFICO

TÍTULO: Avaliação do papel do lpg-2 na migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum*

Evolution of the role of lpg-2 in the migration of dendritic cells infected by *Leishmania infantum*

Ingrid Ramalho Alves ¹, Amanda Rebouças Paixão ², Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam ³

1 Acadêmica do curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil, 2 Doutoranda em patologia humana no Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz Salvador, Bahia, Brasil, 3 Pesquisadora em Saúde Pública no Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO:

Introdução: A *Leishmania* é um parasito intracelular capaz de causar lesão na pele, mucosa e órgãos internos. A disseminação e homing de células infectadas contendo antígenos do parasito são fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Pouco se conhece sobre a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* bem como mecanismos associados a este processo. **Objetivo:** Avaliar o papel do LPG-2 (do inglês lipophosphoglycan glyconjugate 2), na migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum*. **Metodologia:** Avaliamos a migração, a formação de complexos de adesão e a dinâmica de actina nas células dendríticas humanas infectadas por *Leishmania infantum* selvagem, nocaute para o gene LPG-2 ou addback, utilizando o sistema Transwell e a microscopia de fluorescência. **Resultados:** As células infectadas por *L. infantum* nocaute para o LPG-2 apresentaram uma redução da migração, formação de complexos de adesão e da dinâmica de actina em relação aos outros grupos. **Conclusão:** O LPG-2 apresenta um papel importante na modulação da migração das células dendríticas humanas infectadas por *L. infantum*.

Palavras-chave: Célula dendrítica; *Leishmania*; Migração; LPG

ABSTRACT:

Introduction: the *Leishmania* is an intracellular parasite capable of causing damage to the skin, mucosa and internal organs. The dissemination and homing of infected cells containing parasite antigens are essential for the survival of the parasite in the host and for the establishment of the lesion. Little is known about the migration of dendritic cells

infected by *Leishmania* as well as the mechanisms associated with this process. **Objective:** to evaluate the role of LPG-2 (lipophosphoglycan glyconconjugate 2) in the migration of dendritic cells infected by *L. infantum*. **Methodology:** We evaluated migration, adhesion complex formation and actin dynamics in human dendritic cells infected with wild-type *Leishmania infantum*, knockout for the LPG-2 gene or addback, using the Transwell system and fluorescence microscopy. **Results:** Cells infected by *L. infantum* knockout for LPG-2 showed a reduction in migration, formation of adhesion complexes and actin dynamics in relation to the other groups. **Conclusion:** LPG-2 plays an important role in modulating the migration of human dendritic cells infected by *L. infantum*.

Keywords: Dendritic cell, *Leishmania*, Migration, LPG

Autor correspondente

*³ Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Rua Waldemar Falcão, s/n, Candeal – IGM- Fiocruz

Email: juliana.menezes@bahia.fiocruz.br

Telefone: 71 31762322

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, endêmica, considerada um grande problema de saúde pública ^{1,2}. A organização mundial da saúde estima que 12 milhões de indivíduos estejam infectados por *Leishmania* e que 350 milhões de indivíduos corram risco de serem infectados ^{2,3}. O Brasil possui ainda 90% da incidência dos casos da America Latina ².

A leishmaniose é uma antropozoonose causada por protozoários tripanossomatídeos flagelados do gênero *Leishmania*, podendo apresentar diferentes tipos de manifestações clínicas, desde lesões localizadas na pele que cicatrizam espontaneamente, lesões de pele, que se espalham de forma disseminada, a forma mucocutânea da doença, além da leishmaniose visceral, forma mais grave das leishmanioses que podem levar à morte se não tratada ²⁻⁴. As diferentes formas da leishmaniose estão associadas primariamente à espécie do parasito e também a condições inerentes ao hospedeiro, como o sistema imune ⁴.

A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência deste parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão⁵⁻⁷. Uma vez introduzido na pele por flebotomíneos infectados, a *Leishmania* interage com uma variedade de células imunes, inclusive as células dendríticas (DCs), que são células apresentadoras profissionais de antígeno responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos à linfócitos T naive^{7,8}. As células dendríticas podem deixar o local da infecção e migrar para outras áreas, através dos linfonodos, como o fígado e o baço^{5,6}.

O deslocamento celular ocorre em etapas e é mediado principalmente por filamentos de actina no citoplasma⁹⁻¹⁰. Durante o processo estão incluídos diversos eventos moleculares, que atuam na sinalização dos feixes de actina ancorados à matriz extracelular⁸⁻¹⁰. Para que ocorra a migração é necessário que sejam desenvolvidos alguns processos que se iniciam com: a protusão dos pseudópodes, que estimula a membrana para a face anterior da célula; sua adesão, na qual o citoesqueleto se liga ao substrato; e por fim a liberação dos complexos focais^{7,9}.

A actina atua auxiliando na locomoção celular e ancorando os seus filamentos aos complexos de adesão, composto por diversas proteínas citoplasmáticas, inclusive FAK e paxilina, promovendo a montagem de aderências focais e contribuindo na comunicação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto⁷⁻¹⁰.

Adicionalmente, proteínas da família RhoGTPase participam da polimerização dos filamentos da actina¹⁰. Neste processo, proteínas localizadas na borda anterior, conhecidas como Rac1 e Cdc42, atuam no recrutamento do complexo Arp2/3, que por sua vez promove a formação de lamelipódios e filopódios durante a contração celular^{10,11}. No sentido do deslocamento, na região posterior da célula, RhoA é responsável pela contração do citoesqueleto de actina e miosina nessa região, participando ativamente do desprendimento da borda traseira da célula, auxiliando em sua projeção^{10,11}.

Em trabalho realizado anteriormente foi demonstrado que a infecção por *L. infantum* leva a um aumento na migração de células dendríticas, associada ao aumento da expressão de proteínas envolvidas em formação de complexos de adesão, assim como sua fosforilação⁷. Os autores mostraram ainda um aumento da polimerização de filamentos de actina e da expressão de CCR7 nas células infectadas por *L. infantum*, sugerindo uma associação entre essas células e a visceralização da doença⁷.

Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são componentes que atuam de forma significativa durante a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado

¹². Assim como todos os parasitos da família tripanossomatídeos, a *Leishmania* é caracterizada pela presença de um glicocálice ¹³. Estudos recentes demonstraram a relevância do glicoconjugado de superfície de *Leishmania*, o lipofosfoglicano (LPG), na interação com células hospedeiras, no mecanismo de sobrevivência do parasito, bem como no estabelecimento da infecção ¹³.

Entretanto, não se conhece sobre o papel do LPG de *Leishmania* na adesão e migração de células do hospedeiro infectadas por este parasito. Nossa hipótese é que o LPG-2 de *Leishmania infantum* participa da modulação da migração de células dendríticas, contribuindo para a apresentação de antígenos em linfonodos drenantes e para a disseminação da doença no hospedeiro vertebrado.

Para compreender melhor os mecanismos, avaliamos a migração direcional, a formação de complexos de adesão e a dinâmica de actina em células dendríticas humanas infectadas por *Leishmania infantum* nocaute para o gene LPG-2, analisando assim o papel do fator de virulência.

MATERIAIS E METÓDOS

Este trabalho é um estudo experimental realizado no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia (LAIPHE), localizado no Instituto Gonçalo Muniz – Fiocruz-BA.

Comitê de ética

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas (CEP) do Instituto Gonçalo Muniz, conforme parecer de número 2.751.354 e segue com os princípios de ética na pesquisa definidos pela Resolução CNS 466/12 II.4.

Cultivo de células dendríticas (DCs) por separação de PBMC

Para cultivo de DCs, amostras de sangue de doadores saudáveis foram coletadas em tubos de 10mL com EDTA, transferidas e em seguida diluídas (1:1) em PBS. Após a diluição, o sangue foi sobreposto em Ficoll-Histopaque. As amostras foram centrifugadas três vezes e as nuvens de PBMC foram coletadas. Em seguida, as células foram contadas na câmara de Neubauer, passadas em coluna magnética para isolamento de células

CD14+ e foram ressuspensas e plaqueadas com RPMI suplementado com GM-CSF [50ng/ml] + IL4 [100UI/ml] por 7 dias.

Cultivo de parasitos

Parasitos de *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) derivados de amastigotas isoladas de linfonodo da pata de camundongos C57BL/6 foram mantidos em meio ágar-sangue NNN em estufa B.O.D. a 24°C e em meio HOMEM para as sucessivas passagens. Parasitos de *L. infantum lpg2*^{-/-} obtidos por sistema CRISPR/Cas9, cedidos pela Dra. Valéria Borges – IGM Fiocruz - BA, foram cultivados em meio HOMEM em estufa B.O.D. a 24°C. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos.

Infecção de células dendríticas (DC's)

Para realização dos ensaios de migração e imunofluorescência, um total de 2x10⁵ de células dendríticas foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas por *L. infantum* selvagem e *L. infantum* nocaute para o gene *lpg-2* na proporção de 20:1 por 4 horas. As células foram então lavadas e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 ou 48 horas para os ensaios de migração e 48 horas para os ensaios de imunofluorescência.

Avaliação da migração direcional de células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg-2*

A avaliação direcional da migração de células dendríticas infectadas ou não por *L. infantum* nocaute para o gene *LPG-2* foi realizada na presença de quimioatratores (CCL3 para células dendríticas), utilizando sistema *Transwell*. A análise da migração das células foi observada pela contagem do núcleo de células que atravessaram a membrana do inserto da *Transwell*, com auxílio de microscopia de fluorescência.

Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg-2*

Células dendríticas derivadas de monócitos, isoladas de sangue periférico de doadores saudáveis foram plaqueadas na concentração de 2x10⁵ células por poço. As células foram infectadas por *L. infantum lpg2*^{-/-} ou *L. infantum* selvagem ou *L. infantum add back* ambos em fase estacionária. Após a infecção, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído a4%. Em seguida, foi realizada a avaliação da formação de

complexos de adesão nestas células por imunofluorescência para p-paxilina e p-FAK, utilizando anticorpos específicos para estas moléculas. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal e a intensidade de fluorescência de 30 células por grupo será quantificada utilizando o software ImageJ.

Avaliação da dinâmica de actina em células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg-2*

Células dendríticas derivadas de monócitos, isoladas de sangue periférico de doadores saudáveis foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células por poço. As células foram infectadas por *Leishmania infantum lpg2^{-/-}* ou *Leishmania infantum* selvagem ou *add back*, ambos em fase estacionária. Após a infecção, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com paraformaldeído a 4%. A avaliação da polimerização de actina foi realizada por imunofluorescência para F-actina, utilizando faloidina. Adicionalmente, a atividade de moléculas envolvidas na dinâmica de polimerização de actina, como Rho, Rac, Cdc42 e arp2/3, foi avaliada, utilizando anticorpos específicos para estas moléculas. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio confocal e a intensidade de fluorescência de 30 células por grupo será quantificada utilizando o software ImageJ.

Análise estatística

Os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes e para comparação entre dois grupos entre si, com distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

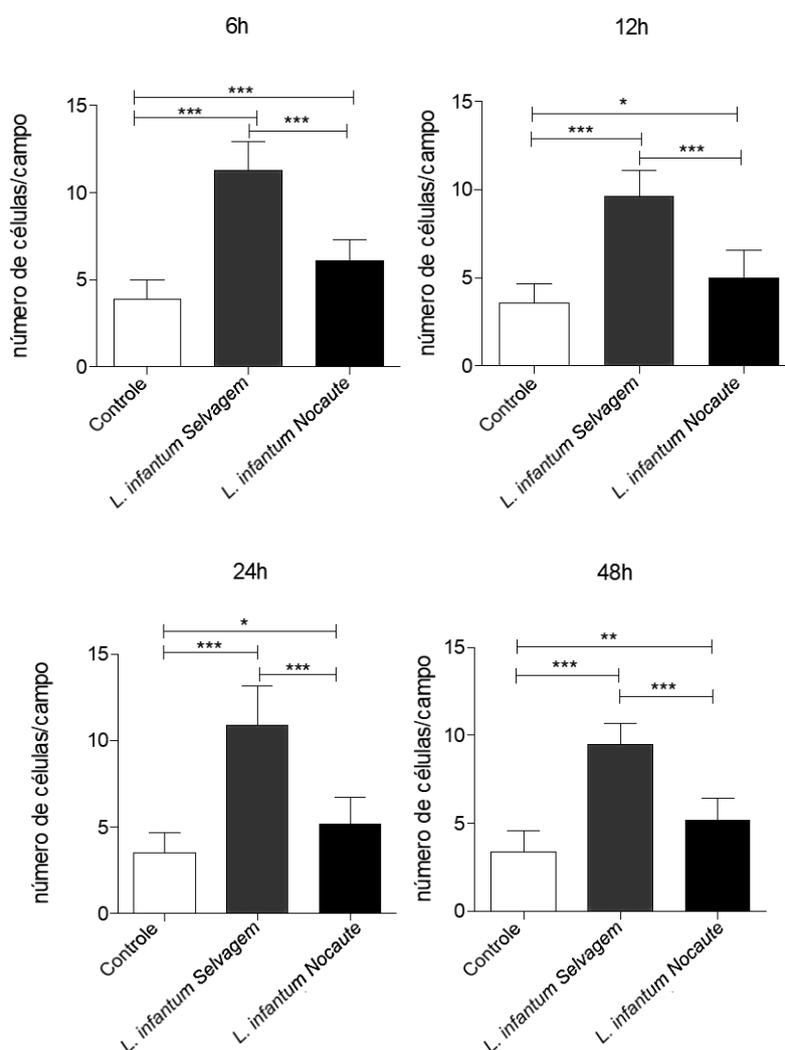
RESULTADOS

Células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum* nocaute para o gene *LPG-2* apresentaram diminuição da migração

Para avaliar a migração de células dendríticas infectadas ou não por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, foram realizados ensaios de migração direcional na presença do quimioatratador específico (CCL3/MIP-1 α), utilizando câmaras Transwell. Os resultados mostram um aumento na migração das células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas ao grupo controle, não infectado, já os que foram

infectados com *Leishmania infantum* nocaute apresentaram uma diminuição em comparação aos que foram infectados pela *Leishmania infantum* selvagem, nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção.

Figura 1 - Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por *Leishmania*. Células dendríticas foram infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2* por 4 horas. Após 6, 12, 24 ou 48h, as células foram submetidas a migração e apresentaram como resultados uma diminuição da migração de células infectadas por *L. infantum* nocaute quando comparadas a *L. infantum* selvagem. As células migrantes, que se encontravam na parte inferior do inserto, foram contadas (10 campos aleatórios) em microscópio de fluorescência convencional. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (teste de *t* student). Resultado representativo de 2 experimentos.

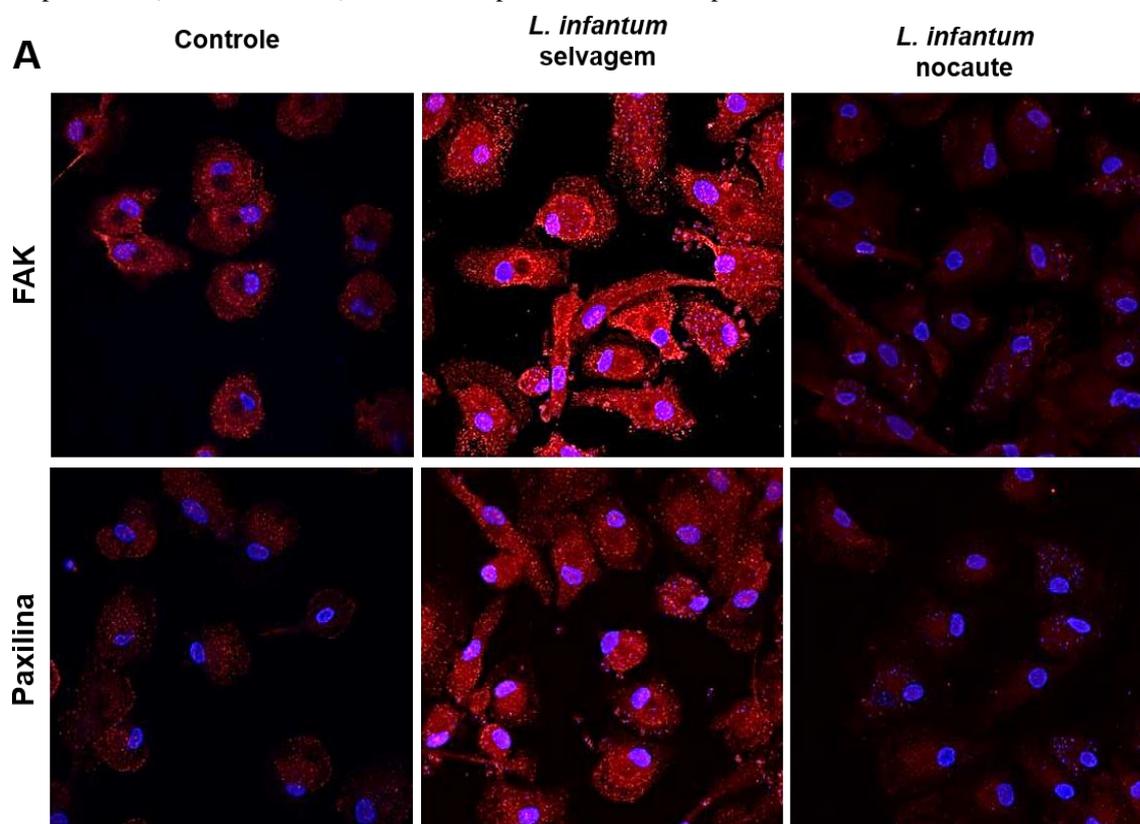


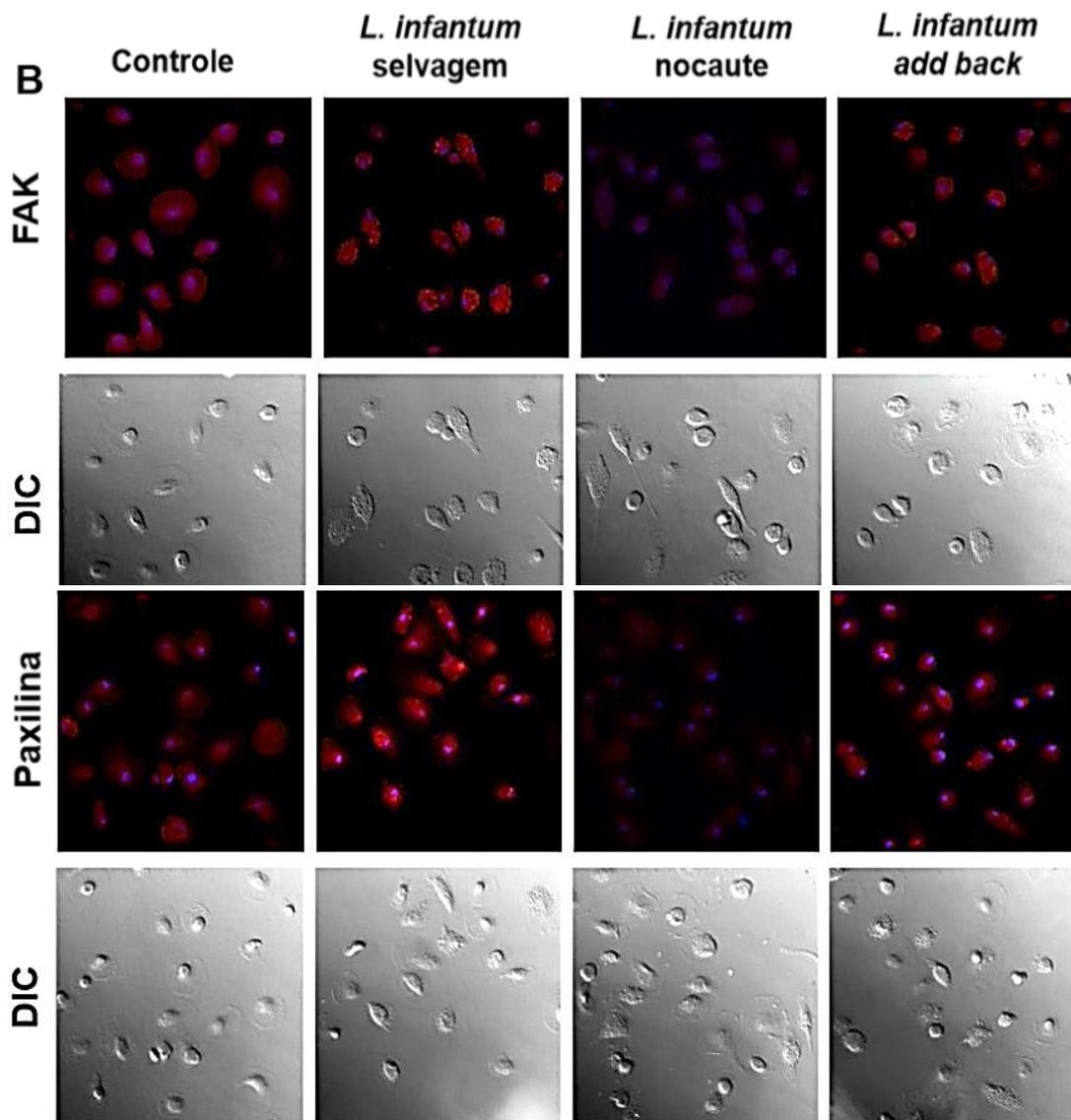
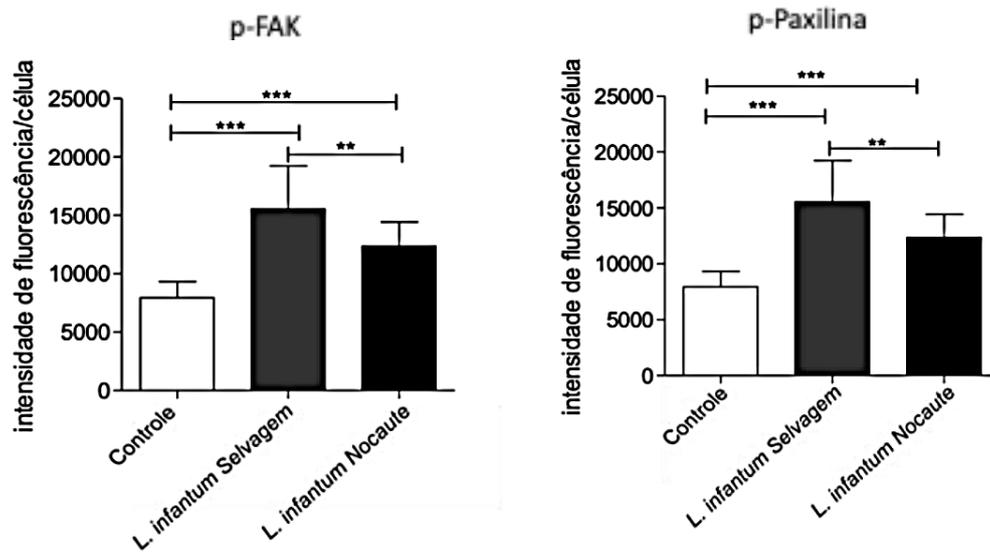
Células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene LPG-2 apresentaram diminuição na formação de complexos de adesão

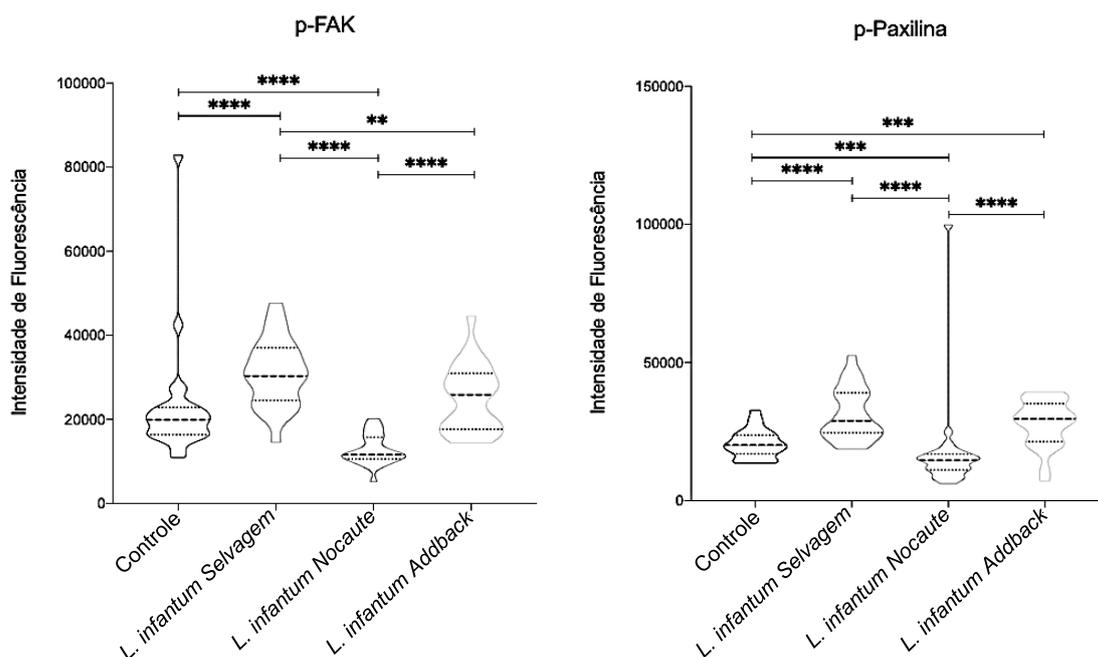
Para a avaliar da formação dos complexos de adesão em células dendríticas humanas infectados ou não por *L. infantum* selvagem, nocaute para o gene *lpg2* ou *add*

back, foi feita a imunomarcação das células utilizando anticorpos para FAK e paxilina e, em seguida, foi feita a análise. Os resultados mostram um aumento da expressão de FAK e paxilina em células dendríticas infectados por *L. infantum* selvagem, *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e *L. infantum add back* quando comparadas ao grupo controle não infectado. Entretanto, observamos também uma redução da expressão destas moléculas em células dendríticas infectados por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*, quando comparado àqueles infectados por *L. infantum* selvagem (Figura 2A). Foram realizados ainda ensaios adicionais de avaliação da formação de complexos de adesão com adição de um grupo de células infectadas com o parasito *add back*. Adicionalmente, os resultados mostram um aumento da expressão de FAK e paxilina em células dendríticas infectados por *L. infantum add back*, em comparação àqueles infectados por *L. infantum* nocaute (Figura 2B).

Figura 2- Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem (A, B), nocaute para o gene *lpg2* (A, B) ou *add back* (B) foram marcadas com anticorpo anti-FAK e anti-paxilina fosforiladas. Foram quantificadas de 25 a 30 células para cada grupo. Como resultado as células infectadas por *L. infantum* nocaute apresentaram uma diminuição da expressão em comparação com a *L. infantum* selvagem Vermelho - anti-FAK ou paxilina fosforilada; azul – DAPI. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (teste de *t* student). Resultado representativo de 2 experimentos



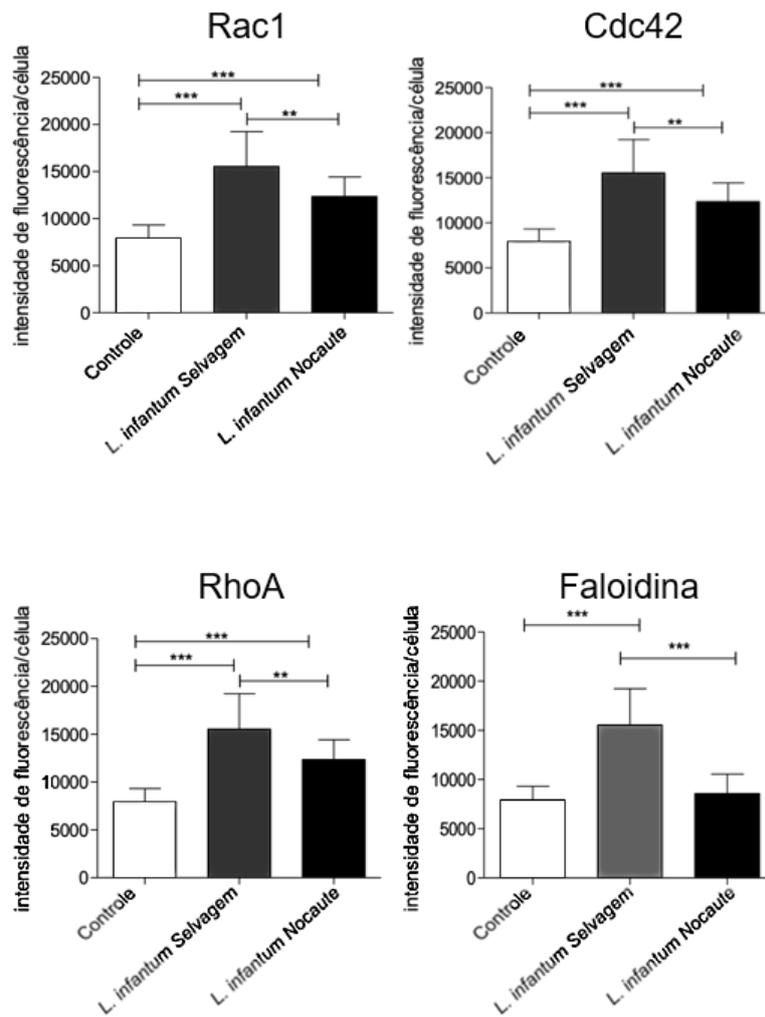
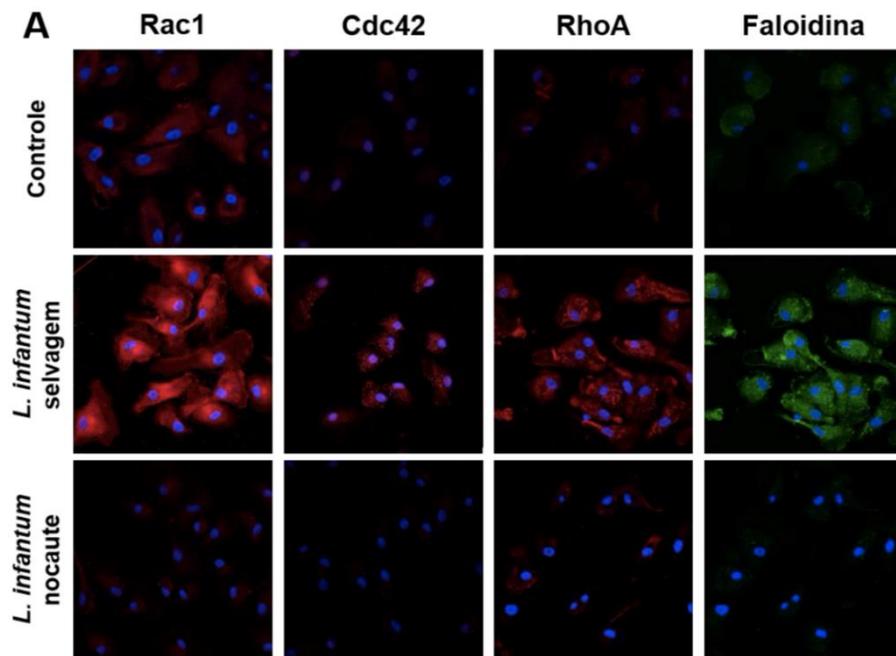


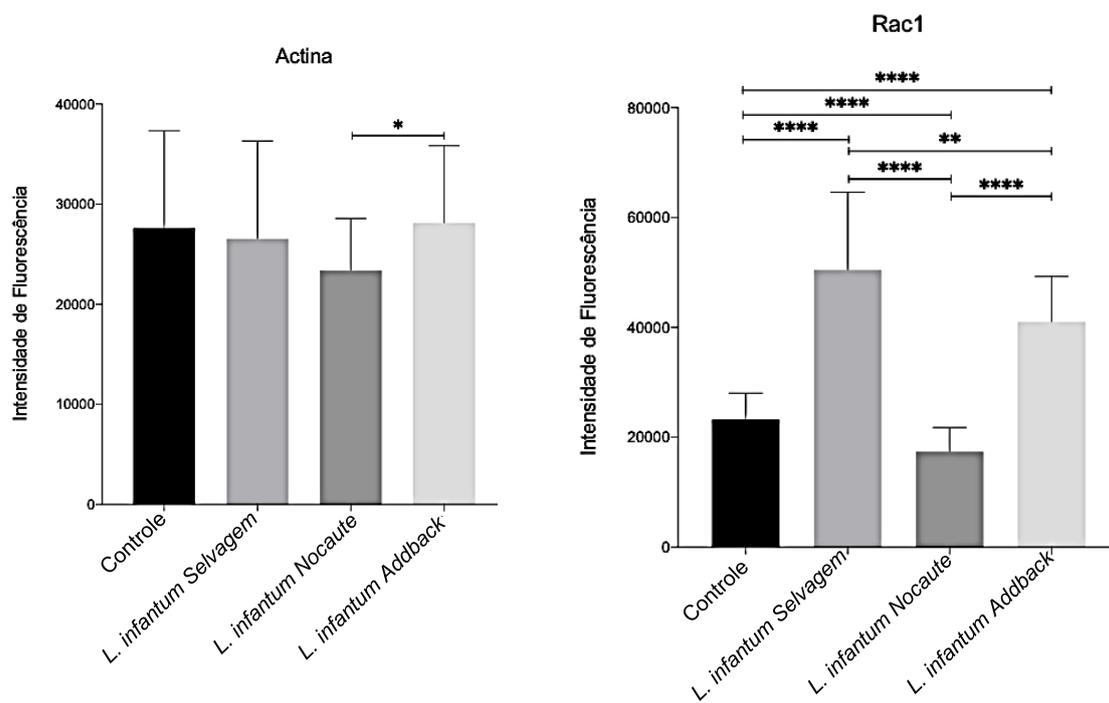
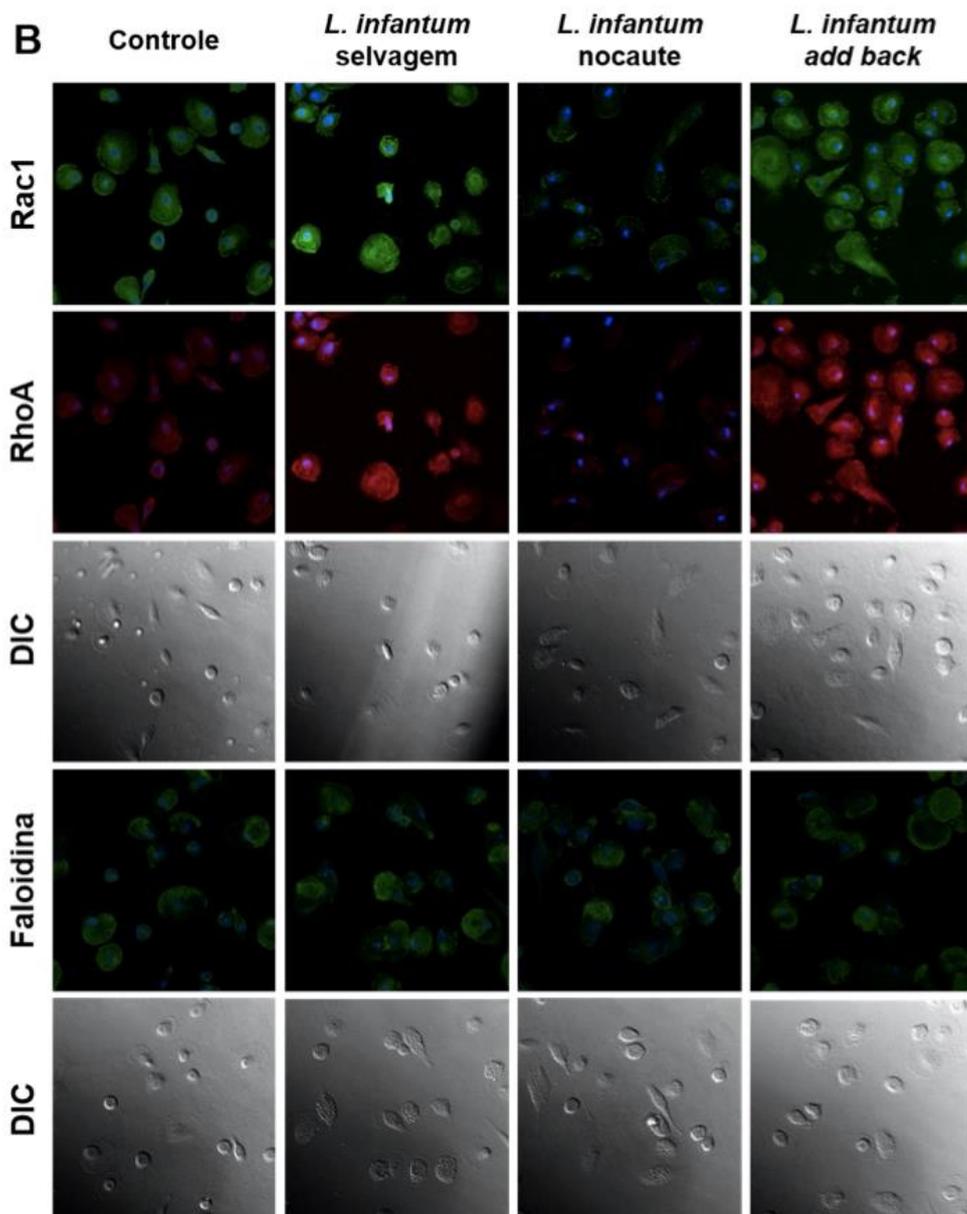


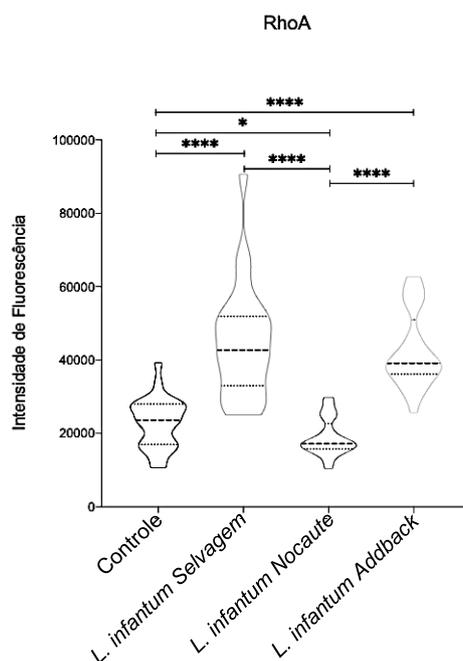
Células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene LPG-2 apresentaram diminuição na polimerização de actina

Os resultados mostram um aumento da expressão de Rac1, Cdc42, RhoA e Faloidina nas células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado (Figura 3A). Foram realizados ainda ensaios adicionais de avaliação da polimerização dos filamentos de actina com adição de um grupo de células infectadas com o parasito *add back*. Os resultados mostram um aumento da expressão de Rac1 e RhoA nas células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas não infectadas. Os resultados mostram ainda que as células infectadas por *L. infantum add back* apresentaram uma expressão de Rac1 e RhoA maior do que aquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* (Figura 3B).

Figura 3 - Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum*. Células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem (A e B), nocaute para o gene *lpg2* (A e B) e *add back* (B) foram marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti-RhoA e anti-Cdc42 (somente A). (A) Intensidade de fluorescência em marcação de RhoA, Rac1, Cdc42 e faloidina. (B) Intensidade de fluorescência em marcação de Rac1, RhoA e faloidina. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software ImageJ. Vermelho, anti-Rac1, anti-RhoA ou anti-Cdc42; Verde, faloidina ou Rac1; azul, DAPI, núcleo da célula. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ (teste de *t* student). Resultado representativo de 2 experimentos.







DISCUSSÃO

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos e as células dendríticas são células hospedeiras que desempenham um papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção e na imunopatologia da doença ¹⁴. A interação entre células hospedeiras e as diversas espécies de *Leishmania* é bastante complexa, tendo em vista que os parasitos expressam em sua superfície diferentes ligantes que podem interagir com múltiplos receptores da célula, levando a diferentes desfechos da infecção ¹⁵.

Inicialmente, com o objetivo de tentar esclarecer o papel do LPG na migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum* avaliamos a migração destas células infectadas com parasito selvagem ou nocaute para o gene LPG-2. Os resultados mostram um aumento na migração das células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem quando comparadas ao grupo controle não infectado, mas não de células dendríticas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas após infecção. Estes resultados sugerem um papel importante para o LPG na modulação da migração induzida por *L. infantum* nestas células.

Estudos anteriores demonstraram que a *Leishmania* é capaz de modular a adesão e migração de células hospedeiras ^{7, 16, 17}. Adicionalmente, foi mostrada uma redução da migração de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*¹⁹. Em contraste, demonstraram que a infecção por *Leishmania major* promove um aumento do deslocamento de células dendríticas para os linfonodos drenantes ^{20, 21}. Além disso, estudos mostraram que a infecção por *L. major* estimula a capacidade da migração de células dendríticas a

partir da modulação de receptores de quimiocinas, evidenciando uma relação entre o aumento da expressão de CCR7 com o aumento da migração destas células ²². A importância da célula dendrítica na disseminação da doença já havia sido demonstrada pelo nosso grupo, em um estudo realizado recentemente, observou-se um aumento da migração de células dendríticas após a infecção por *L. infantum*, mas não por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ⁷.

O LPG confere proteção a lise mediada pelo complemento, interage com os receptores do tipo Toll-like (TLR), suprime a fosforilação da p38 MAP quinase, modula a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e de citocinas ²³⁻²⁶. Entretanto a relação do LPG com a migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania* ainda precisa ser estudada. Este é um dos primeiros estudos que sugere um papel para o LPG na modulação da migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania*, caracterizando esta molécula como um dos possíveis mecanismos envolvidos na migração de células e, conseqüentemente, na disseminação da doença.

Um dos mecanismos importantes para processo de migração é a formação dos complexos de adesão, uma vez que promove a adesão da célula à matriz extracelular ^{8,9,27,28}. Buscando compreender os mecanismos envolvidos na modulação da migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, avaliamos a formação do complexo de adesão nestas células. Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento na expressão de FAK e paxilina nas células dendríticas infectadas pela *L. infantum* selvagem quando comparadas àquelas infectadas por *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2* e ao grupo controle não infectado, sugerindo um aumento da formação de complexos de adesão nestas células.

A associação entre o aumento da adesão celular e o aumento da migração já foi demonstrado anteriormente, estudos avaliando a formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *T. cruzi* mostram um aumento da expressão de FAK associado ao aumento da migração destas células e a evolução da cardiomiopatia chagásica ²⁹. Adicionalmente, foi demonstrado que o aumento da formação de complexos de adesão está relacionado ao aumento da migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum*, mas não por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ⁷.

Outro mecanismo que atua significativamente no processo de migração é a polimerização dos filamentos de actina, sendo essencial para a contração das células e

formação das protrusões ^{8,28}. Os filamentos de actina são controlados e modulados por proteínas atreladas a eles (proteínas de ligação à actina – ABPs). As GTPases da família Rho servem como interruptores moleculares dependentes de GTP, dentre elas, podemos citar a Cdc42, Rac1 e RhoA, que controlam respectivamente a formação de filopódio, lamelipódio e fibras de estresse ^{9,30,31}.

Com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem ou nocaute para o gene *lpg2*, avaliamos a polimerização do citoesqueleto de actina nessas células. Nossos resultados mostram uma variação da marcação com faloidina entre os experimentos. Como a polimerização destes filamentos é um processo extremamente dinâmico, para melhor avaliar este fenômeno, partimos para avaliar a expressão de moléculas da família Rho.

Observamos um aumento da expressão de Rac1, RhoA, Cdc42 em células dendríticas infectadas por *L. infantum* selvagem e uma redução da expressão dessas moléculas no grupo infectado pela *L. infantum* nocaute para o gene *lpg2*. Este dado sugere que a modulação da dinâmica de actina é um possível mecanismo associado ao aumento da migração induzida por LPG de *L. infantum* nestas células. Dados da literatura mostram que a inibição de Rho GTPases provoca uma modulação na migração celular ³². Cdc42 e Rac1 são responsáveis pela indução da polimerização de actina, via complexo Arp2/3 ³³. Além da Cdc42 e Rac1, RhoA é de extrema importância no processo de migração celular, uma vez que é responsável pela formação de fibras de estresse na região do corpo celular e região posterior da célula e tem associação com a inibição de protrusões ^{8,34}. Além disso, esta molécula está relacionada com a inibição da polimerização da actina, através da ativação de ROCK ³⁵.

Os mecanismos envolvidos na disseminação da *Leishmania* no hospedeiro e sua relação com a migração de células dendríticas infectadas são pouco conhecidos. Além de fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos ao parasito são componentes importantes para a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado e estabelecimento da lesão ¹². Entretanto, não se conhece o papel do LPG de *Leishmania* na adesão e migração de células do hospedeiro infectadas por este parasito. Este é um dos primeiros trabalhos que demonstra que o LPG de *L. infantum* participa na modulação da migração de células dendríticas humanas infectadas, induzindo a migração, possivelmente contribuindo para a apresentação de antígenos em linfonodos drenantes, e para a disseminação da doença em hospedeiros vertebrados. Estudos para melhor entender o papel do LPG no processo

de adesão e migração celular e sua relação a disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

CONCLUSÃO

O LPG de *L. infantum* participa da modulação da migração de células dendríticas humanas infectadas.

TITLE: Evolution of the role of lpg-2 in the migration of dendritic cells infected by *Leishmania infantum*

ABSTRACT:

Introduction: the *Leishmania* is an intracellular parasite capable of causing damage to the skin, mucosa and internal organs. The dissemination and homing of infected cells containing parasite antigens are essential for the survival of the parasite in the host and for the establishment of the lesion. Little is known about the migration of dendritic cells infected by *Leishmania* as well as the mechanisms associated with this process.

Objective: to evaluate the role of LPG-2 (lipophosphoglycan glyconconjugate 2) in the migration of dendritic cells infected by *L. infantum*. **Methodology:** We evaluated migration, adhesion complex formation and actin dynamics in human dendritic cells infected with wild-type *Leishmania infantum*, knockout for the LPG-2 gene or addback, using the Transwell system and fluorescence microscopy. **Results:** Cells infected by *L. infantum* knockout for LPG-2 showed a reduction in migration, formation of adhesion complexes and actin dynamics in relation to the other groups. **Conclusion:** LPG-2 plays an important role in modulating the migration of human dendritic cells infected by *L. infantum*.

Keywords: Dendritic cell, *Leishmania*, Migration, LPG

REFERÊNCIAS

1. ALVAR et al. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. **Plos one**, 2012.
2. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. v. 91, p. 285–296, 2016.

3. BANULS, A.L. M.; Hide, and F. Prugnolle. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans, **Adv Parasitol**, v. 64, p. 1-109, 2007.
4. DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infect Dis**, 2004. 27(5): p. 305- 18.
5. GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 687-95, 1998.
6. VON STEBUT, E. et al. Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188,p. 1547-52, 1998.
7. REBOUÇAS, A. Leishmania-Induced Dendritic Cell Migration and Its Potential Contribution to Parasite Dissemination. *Microorganisms*, 2021.
8. BANCHEREAU, J; STEINMAN, RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, vol 52, 1998.
9. VÉROLLET C, CHARRIÈRE GM, LABROUSSE A, COUGOULE C, LE CABEC V, MARIDONNEAU-PARINI I. Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur J Immunol*. 2011; 41(10):2805-13.
10. RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, v. 70, n. 3, p. 389–399, ago. 1992.
11. ALLEN, W. E. et al. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal Cell Science*, v. 110, Pt 6, p. 707–720, 1997.
12. FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

13. SCHLEIN, Y.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Released glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 353–355, 1990.
14. ASHOK, D.; ACHA-ORBEA, H. Timing is everything: Dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*, v. 30 (10), p. 490–507, 2014.
15. MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: Multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 4, p.315-22, 1993.
16. BRAY, R. S. et al. The effect of parasitization by *Leishmania mexicana mexicana* on macrophage function in vitro. *Acta Trop*, v. 40, n. 1, p. 29–38, 1983.
17. CARVALHAL, D. G. F. et al. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: Application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Experimental Parasitology*, v. 107, n. 3–4, p. 189–199, 2004.
18. DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 264, 2016.
19. HERMIDA MD, DORIA PG, TAGUCHI AM, MENGEL JO, DOS-SANTOS W. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC infectious diseases*. 2014
20. LAI, G. N. et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathogens*, v. 4, p. 11, 2008.
21. MISSLITZ, A. C. et al. Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology*, v. 34, p. 715-725, 2004.
22. STEIGERWALD, M e MOLL H. *Leishmania major* Modulates Chemokine and Chemokine Receptor Expression by Dendritic Cells and Affects Their Migratory Capacity. *Infectious Immunology*, v. 73, n.7, p. 2564-2567, 2005.

23. CHANDRA, D.; NAIK, S. Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 154, n. 2, p. 224–234, 2008. 50
24. CHAPARRO, V. et al. Leishmania donovani lipophosphoglycan increases Macrophage-Dependent chemotaxis of CXCR6-Expressing cells via CXCL16 induction. *Infection and Immunity*, v. 87, p. e00064-19 2019.
25. KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, v. 136, n. 10, p. 1193–1199, 2009.
26. PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 145, n. 12, p. 4311–6, 1990.
27. ZAMIR, E.; GEIGER, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, v. 114, n. Pt 20, p. 3583–3590, 2001.
28. WIESNER, C. et al. Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adhesion and Migration*, v. 8, n. 3, p. 179–191, 2014.
29. MELO, T. G. et al. Trypanosoma cruzi down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e180593, 2019.
30. LEE, S. H.; DOMINGUEZ, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells*, v. 29, n. 4, p. 311–325, 2010.
31. TAMBE, D. T. et al. Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nature Materials*, v. 10, p. 469- 75, 2011.
32. SANDER, E. E. et al. Rac downregulates Rho activity: Reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *Journal of Cell Biology*, v. 147, p. 1009-22, 1999.

33. SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion and Migration*, v. 5,2, p. 170-80, 2011.
34. ROTTNER, K.; HALL, A.; SMALL, J. V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current Biology*, v. 9, n. 12, p. 640–648, jun. 1999.
35. ZEBDA, N. et al. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 5, p. 1119–1127, nov. 2000.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Juliana Menezes pelo compromisso e cuidado à elaboração deste trabalho; A todos do grupo PV/JP pelo apoio e auxílio durante a execução dos experimentos; A agência de fomento Fapesb pela bolsa de iniciação científica.

DATA DE ENTREGA: 10 de novembro de 2022

ANEXO A – Instrumento de pesquisa**DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE**

Certificamos que o artigo enviado à Revista de Ciências Médicas e Biológicas é um trabalho original, sendo que seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico.

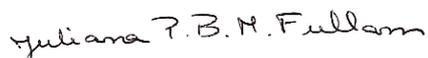
Salvador, 10 de novembro de 2022



Ingrid Ramalho Alves



Amanda Rebouças Paixão



Juliana Perrone Bezerra De Menezes Fullam

2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO

REVISTA: Revista de Ciências Médicas e Biológicas

Normas editoriais:

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:

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.

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.

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.

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 196/96 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.

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.

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.

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

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”.

Data e assinatura

Os co-autores, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na Norma de Vancouver :

2.1 Os textos deverão 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.

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 eslides 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.

2.3 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).

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

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

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.

2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1** a **2.7.2**, **na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais

a) Cabeçalho, em que devem figurar:

- 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;
- 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.

b) 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 - 6028/1990 da ABNT, e não exceder as 250 palavras recomendadas. Se o texto for em outra língua espanhol ou francês mesmo procedimento.

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

2.7.2 Texto

a) 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.

b) 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).

c) 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.

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

e) Conclusões – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

a) 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** and interfere with the bacterial system and tissue system.”^{3,4,7-10} ou **alfanumérico um autor** Gatewood³¹ (2012), **dois autores** Cotti, Santos¹² (2016), três autores Azer, Safi, Almeida²³ (2011) e mais que três 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.

b) Agradecimentos (quando houver).

c) Data de entrega dos originais à redação da Revista.