



UNIDADE DE ENSINO SUPERIOR DE FEIRA DE SANTANA

BACHARELADO EM BIOMEDICINA

WESLEY DE JESUS SANTOS

A HETEROGENEIDADE DO ASTRÓCITO NA NEUROINFLAMAÇÃO:

Uma revisão sistemática

FEIRA DE SANTANA – BA

2020

WESLEY DE JESUS SANTOS

A HETEROGENEIDADE DO ASTRÓCITO NA NEUROINFLAMAÇÃO:

Uma revisão sistemática

Trabalho de Conclusão de Curso da Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. M. Phil. Markley Silva Oliveira Junior

Co-orientador: Prof. Esp. Felicson Leonardo Oliveira Lima

FEIRA DE SANTANA - BA

2020

S237h Santos, Wesley de Jesus.

A heterogeneidade do astrócito na neuroinflamação: Uma revisão sistemática. / Wesley de Jesus Santos. Edição do autor. – Feira de Santana, 2021.
30f; il.

Orientador: Prof^o. M. Phil. Markley Silva Oliveira Junior.

Co-orientador: Prof. Esp. Felicson Leonardo Oliveira Lima

TCC (graduação) Bacharelado em Biomedicina – Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF - 2021.

Data da defesa: 27/02/2021.

1. Astrogliose reativa. 2. Heterogeneidade de astrócitos. 3. Neuroinflamação. 4. I. Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF. II. Título.

CDU: 616.8

Ficha Catalográfica Elaborada por: Deivisson Lopes Pimentel Bibliotecário CRB 5/1562



WESLEY DE JESUS SANTOS

A HETEROGENEIDADE DO ASTRÓCITO NA NEUROINFLAMAÇÃO:
Uma Revisão Sistemática

Feira de Santana, 27/ 07/ 2021

Banca examinadora:



Prof. Dr. João Roberto da Rocha

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana

Coordenador da Disciplina TCC2

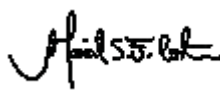


Prof. M. Phil Marley Silva Oliveira Junior

Heinrich Heine University, University Clinic, Neurology Department, Küry Lab, Düsseldorf,

Germany

Orientador



Prof. Dr. Afonso Costa

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana

Examinador

LISTA DE SIGLAS

BAFF - Fator de ativação de células B

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

DAMPS - Padrões Moleculares Associados a Danos

DeCS - Descritores em Ciência da Saúde

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

FASL - Ligante Fas

FOL - Felicson Leonardo Oliveira Lima

GDNF - Fator neurotrófico derivado de Glia

LPS - Lipopolissacarídeos

MLNP - Moléculas ligadas a Neuroproteção

MSOJ - Markley Silva Oliveira Junior

PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses

Shh - Sonic hedgehog

SNC - Sistema Nervoso Central

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VS - Versus

WJS - Wesley de Jesus Santos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fenda sináptica de estilo tripartite mostrando regulação e redistribuição de neurotransmissores e seus precursores desempenhada por astrócitos em tecido em homeostase.	13
Figura 2 Fluxograma de seleção de estudos por processo de pesquisa sistemática de acordo com o Grupo PRISMA (2021).....	16
Figura 3 Graphical abstract: Mecanismos moleculares desempenhados por astrócitos reativos em perfil A1 e A2 na neuroinflamação versus neuroproteção.	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Interleucinas.	17
Quadro 2 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Fatores de transcrição e neurotrofinas.	18
Quadro 3 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Quimiocinas, citocinas e outros fatores.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tabela de contingência de amostras pareadas. Nas linhas as tendências moleculares e nas colunas as atividades neurotóxicas correspondentes.....	15
Tabela 2 Teste de McNemar com valor de $P = 0,002$	16
Tabela 3 Moléculas produzidas, reguladas ou expressadas por astrócitos na neuroinflamação.	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	METODOLOGIA	14
2.1	ESTRATÉGIA DE BUSCA	14
2.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	14
2.3	ANÁLISE DE DADOS	15
3	RESULTADOS.....	15
4	DISCUSSÃO.....	20
5	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXOS	28

A HETEROGENEIDADE DO ASTRÓCITO NA NEUROINFLAMAÇÃO: Uma revisão sistemática

THE ASTROCYTE HETEROGENEITY IN NEUROINFLAMATION: A systematic review

Wesley de Jesus **Santos**¹; Felicson Leonardo Oliveira **Lima**²; Markley Silva Oliveira **Junior**³

1. Graduando em Biomedicina pela Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana - UNEF;
E-mail: wesley.santos.biomed@gmail.com
2. Mestrando em biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS;
E-mail: felicsonleonardo@hotmail.com
3. Doutorando em Ciências Naturais pelo Hospital Universitário de Düsseldorf - HHU.
E-mail: markley.Silva@med.uni-duesseldorf.de

RESUMO

Objetivo: Abordar sistematicamente as tendências moleculares da reatividade astrocitária, qualificando o papel citotóxico ou citoprotetor durante a neuroinflamação. **Materiais e**

Métodos: A revisão sistemática da literatura foi baseada no método PRISMA. Duas bases de dados foram consultadas (Pubmed e Science Direct). Os estudos foram identificados independentemente por três revisores usando pesquisas eletrônicas, sendo essas pesquisas, revisões de literatura publicada entre os anos de 2016 a 2021. **Resultados:** Dezesesseis artigos originais publicados entre 2016 a 2021 foram retidos para a análise de dados. Todos os artigos relataram moléculas pró e anti-inflamatórias, que estão envolvidas intimamente na neuroinflamação, secretadas ou mediadas por astrócitos. Desses artigos, seis abordaram moléculas do tipo interleucinas, quatro dos tipos fatores de transcrição e neurotrofinas e seis dos tipos quimiocinas e citocinas. Uma tendência significativa para citotoxicidade da reatividade astrocitária na neuroinflamação foi observada baseada na análise estatística.

Conclusão: A análise identificou 13 moléculas pró-inflamatórias, equivalente a 61%, com capacidade de influenciar negativamente o processo neuroinflamatório, induzindo a astrogliose e assim impulsionando a progressão da doença. Embora este estudo tenha um nível estatístico significativo, estudos de alto nível são necessários para delinear melhor a heterogeneidade dos astrócitos com outras moléculas não aqui citadas.

Palavras-chave: Heterogeneidade de astrócitos, neuroinflamação, astrogliose reativa.

ABSTRACT

Objective: Systematically approach the molecular trends upon astrocyte reactivity. Qualifying the role of it is cells, whether cytotoxic or cytoprotective, throughout neuroinflammation.

Materials and methods: The systematic literature review was based on the PRISMA method. Two databases were consulted (Pubmed and Science Direct), literature reviews published between the years 2016 to 2021 were collected as a database. The studies were independently identified by three reviewers utilising electronic surveys. **Results:** Sixteen original articles published between 2016 to 2021 were compiled for data analysis. All articles described pro- and anti-inflammatory molecules strictly involved in neuroinflammation, those secreted or mediated by astrocytes. Of these articles, six addressed interleukin-type molecules, four reported transcription factors and neurotrophins, while six described chemokines and cytokines. Based on the statistical analysis hereby performed, a significant trend towards cytotoxicity of reactive astrocytes during neuroinflammation. **Conclusion:** Thirteen pro-inflammatory molecules were identified, those equivalent to 61% of our findings. These molecules are negatively influencing the neuroinflammatory process, inducing gliosis, thus boosting the progression of the disease at least in an acute manner. Due to the statistical confirmation of our findings, this does not eliminate the needings for further studies to better delineate astrocytes' heterogeneity, observing additional events here not investigated.

Keywords: Astrocyte heterogeneity, neuroinflammation, reactive astrogliosis.

1 INTRODUÇÃO

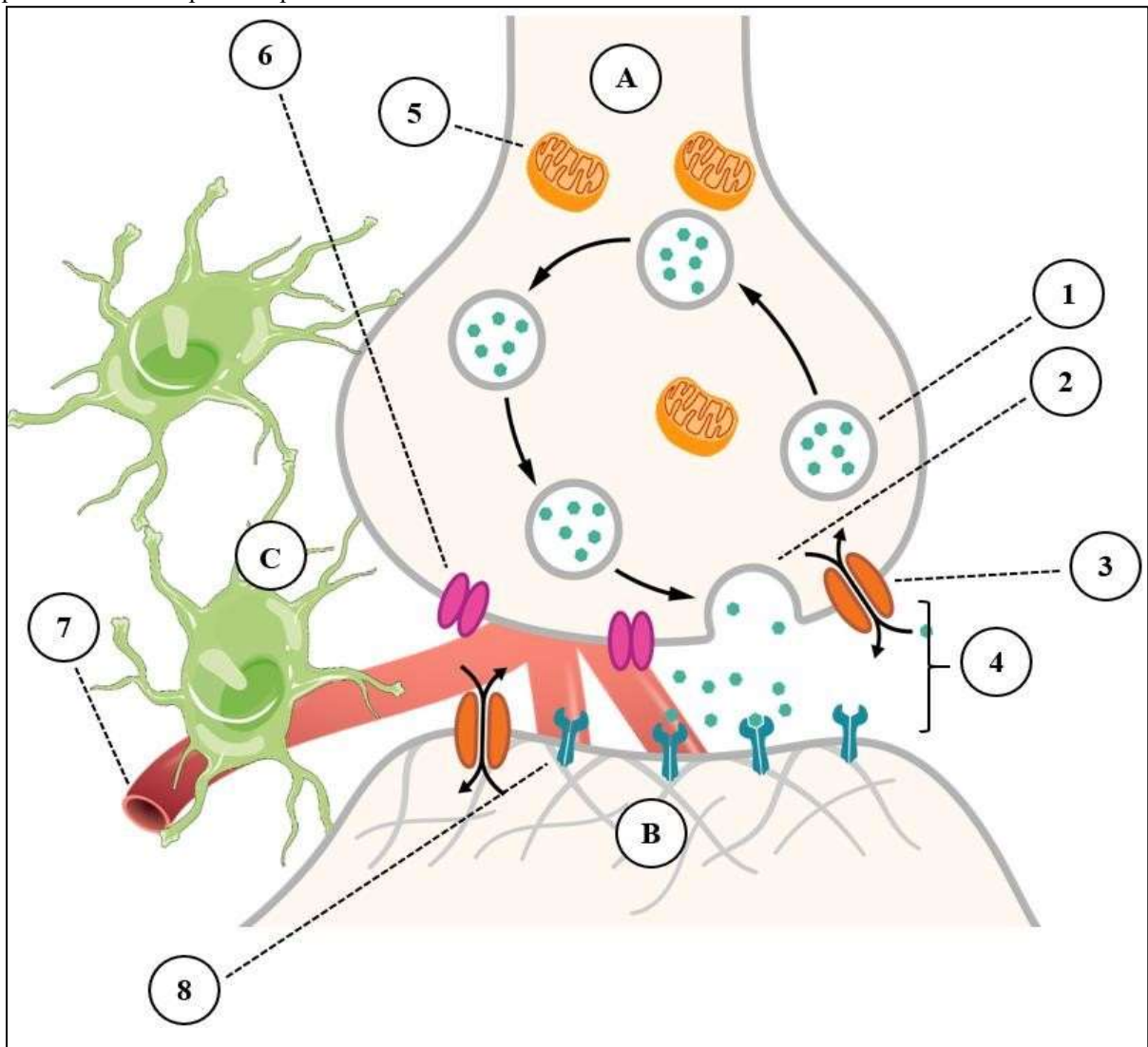
Astrócitos, células alvo dessa revisão, são as células mais abundantes do sistema nervoso central, constituindo cerca de 30% das células neurais. Eles são responsáveis pela sinalização e liberação de citocinas, pela nutrição dos neurônios, além da captação de neurotransmissores (**Figura 1**) (BOZIC et al., 2020). Quando presente na substância branca, é chamado de astrócito fibroso e de astrócito protoplasmático quando encontrado na substância cinzenta. Na retina são conhecidos como glia de Müller enquanto no cerebelo como glia de Bergmann (KHAKH; DENEEN, 2019; REICHENBACH; BRINGMANN, 2020; WESTERGARD; ROTHSTEIN, 2020). No processo inflamatório, o sistema imunológico é o solucionador do problema, com os glóbulos brancos na linha de frente agindo nos órgãos periféricos ao cérebro, enquanto no Sistema Nervoso Central (SNC) esse processo recebe o nome de neuroinflamação, onde os astrócitos e as micróglias são as células principais (TEIXIDÓ et al., 2019; BOZIC et al., 2020).

A neuroinflamação tem como finalidade, conferir homeostase ao tecido cerebral afetado por alguma desregulação tecidual, no entanto, um dano inflamatório prolongado pode destruir estruturas vitais para a saúde neuronal. Várias são as formas de neuroinflamação, tendo como a mais comum, a degradação da bainha de mielina, provocada pela produção de DAMPS (Padrões Moleculares Associados a Danos), estas são moléculas próprias liberadas após um dano ou morte celular, ativando astrócitos e micróglias em perfis pró-inflamatórios, que por fim, ativam vias bioquímicas (DE SOUSA et al., 2016; THELL et al., 2016; GUERRERO-GARCÍA, 2020; SOFRONIEW, 2020). Além disso, engatilhando alterações morfológicas e da natureza secretora de moléculas pró ou anti-inflamatórias esse processo recebe o nome de heterogeneidade astrócitária que se baseia em dois perfis pan-reativos: o perfil A1, com propriedades neurotóxicas e o perfil A2 neuroprotetor (LIDDELOW et al., 2017; ESCARTIN et al., 2021).

O perfil A1 é caracterizado por causar danos ao SNC, liberando moléculas pró-inflamatórias, tais como citocinas e quimiocinas (CXCL12, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, FASL) e suspendendo fornecimento nutricional aos neurônios (LIDDELOW et al., 2017; JOSHI et al., 2019; SAMIDURAI et al., 2020; SOFRONIEW, 2020). O perfil A2 é responsável por secretar moléculas anti-inflamatórias como: IL-10 e IL-4, além de promover a neurogênese, através de neurofinas BDNF e GDNF, que atuam no fornecimento nutricional e da modulação, através de vias como: VEGF, EGF, Shh, Wnt beta catenin, fibrinogênio entre outras, reparando tecidos danificados (THAWKAR; KAUR, 2019; ESCARTIN et al., 2021).

De fato, entender a heterogeneidade astrocitária e a sua finalidade biológica diante das mudanças imunológicas que ele apresenta, é de extrema importância para a sociedade científica, pois esta célula tem um papel importante na promoção de dano e reparo em doenças neuroinflamatórias, no entanto, entender o propósito de cada perfil ainda é algo a se desvendar (BLANCO-SUAREZ et al., 2018). Diante disso, sabendo que os artigos originais sobre astrócitos reativos trazem uma resposta limitada sobre a sua atividade fisiológica no processo neuroinflamatório, esse estudo sistemático tem como objetivo abordar as tendências moleculares, se à uma ação citotóxica ou citoprotetora durante a neuroinflamação.

Figura 1 Fenda sináptica de estilo tripartite mostrando regulação e redistribuição de neurotransmissores e seus precursores desempenhada por astrócitos em tecido em homeostase.



A – Neurônio pré-sináptico. B – Neurônio pós-sináptico. C – Astrócito (astroglia). 1 – Vesículas sinápticas. 2 – Vesícula sináptica fundida à membrana plasmática. 3 – Transportador de membrana. 4 – Fenda sináptica. 5 – Mitocôndria. 6 – Receptores inotrópicos pré-sinápticos. 7 – Vasos sanguíneos. 8 – Receptores inotrópicos pós-sinápticos. Fonte: (PONATH et al., 2018; MATIAS et al., 2019).

2 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão sistemática baseada no método PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (PAGE et al., 2021). A pergunta norteadora foi “Os astrócitos reativos tem tendências moleculares, para uma ação citotóxica ou citoprotetora durante a neuroinflamação?”

2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA

As bases de dados consultadas foram: Pubmed e Science Direct. Os descritores indexados no sistema de Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) foram; neuroinflammation, astrocyte heterogeneity e reactive astrogliosis. A pesquisa incluiu literatura publicada entre os anos de 2016 a 2021. Para a busca foram realizadas três combinações em cada base de dados: (neuroinflammation AND astrocyte heterogeneity); (neuroinflammation AND Reactive astrogliosis); (astrocyte heterogeneity AND Reactive astrogliosis). A pesquisa foi realizada com os descritores nos idiomas português, inglês e espanhol.

A busca foi realizada pelo autor WJS, entre 11 de janeiro de 2021 à 18 de julho de 2021. Após a pesquisa, foram registrados os dados dos artigos (autores, local, desenho do estudo público alvo) em uma planilha no *Excel*. Depois, foram eliminadas as duplicidades por base e entre as bases.

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A seleção ocorreu pelo pesquisador WJS e revisado pelos pesquisadores WJS, FOL e MSOJ. Primeiro foi realizado a leitura dos títulos, depois dos resumos, e por fim, do artigo lido na íntegra. Foram incluídos artigos originais e experimentais, dentre eles foram selecionados os: Ensaios clínicos randomizado e resultados terapêuticos,. Para caráter indutivo do assunto, trazendo conceitos, foi incluído revisões sistemáticas e revisões narrativas. Excluiu-se os estudos duplicados, títulos incompatíveis, advindos de fontes duvidosas, com informações incoerentes e fora do recorte temporal. Além das bases de dados consultadas, foi realizada uma busca reversa, no entanto nenhum artigo contemplou os critérios de inclusão.

2.3 ANÁLISE DE DADOS

Para fazer a análise de dados, as informações obtidas foram organizadas por meio do *software Microsoft Excel 2019*® e analisadas e modeladas por meio do *software Jamovi* versão 1.6.23, onde foi utilizada a ferramenta de análise não paramétrica McNemar para verificar as tendências moleculares, citotóxica ou citoprotetora das moléculas secretadas e mediadas por astrócitos durante a neuroinflamação. Um valor de $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo. Os *softwares Jamovi* e *Microsoft Excel 2019*® também foram utilizados para a construção das tabelas de acordo com a finalidade do trabalho.

3 RESULTADOS

Os resultados da estratégia de pesquisa para esse estudo estão resumidos na **(Figura 2)**. Foram obtidos um total de 1469 artigos somadas nas duas bases de dados escolhidas. Destes artigos, 1.110 foram removidos pela técnica de scanning, analisando apenas o título, 40 foram excluídos pela duplicidade, por análise humana e automatizada pelo *software* Mendeley e 50 foram removidos por motivos diversos. Na triagem sobrou 269 artigos, desses foram descartados 169 por não estarem indexados, sobrando 100 artigos para elegibilidade, após a leitura dos resumos foram removidos 67. No final, 33 artigos foram elegíveis para ser utilizado na revisão. Dos artigos elegíveis, 16 foram utilizados para caracterizar os astrócitos na neuroinflamação.

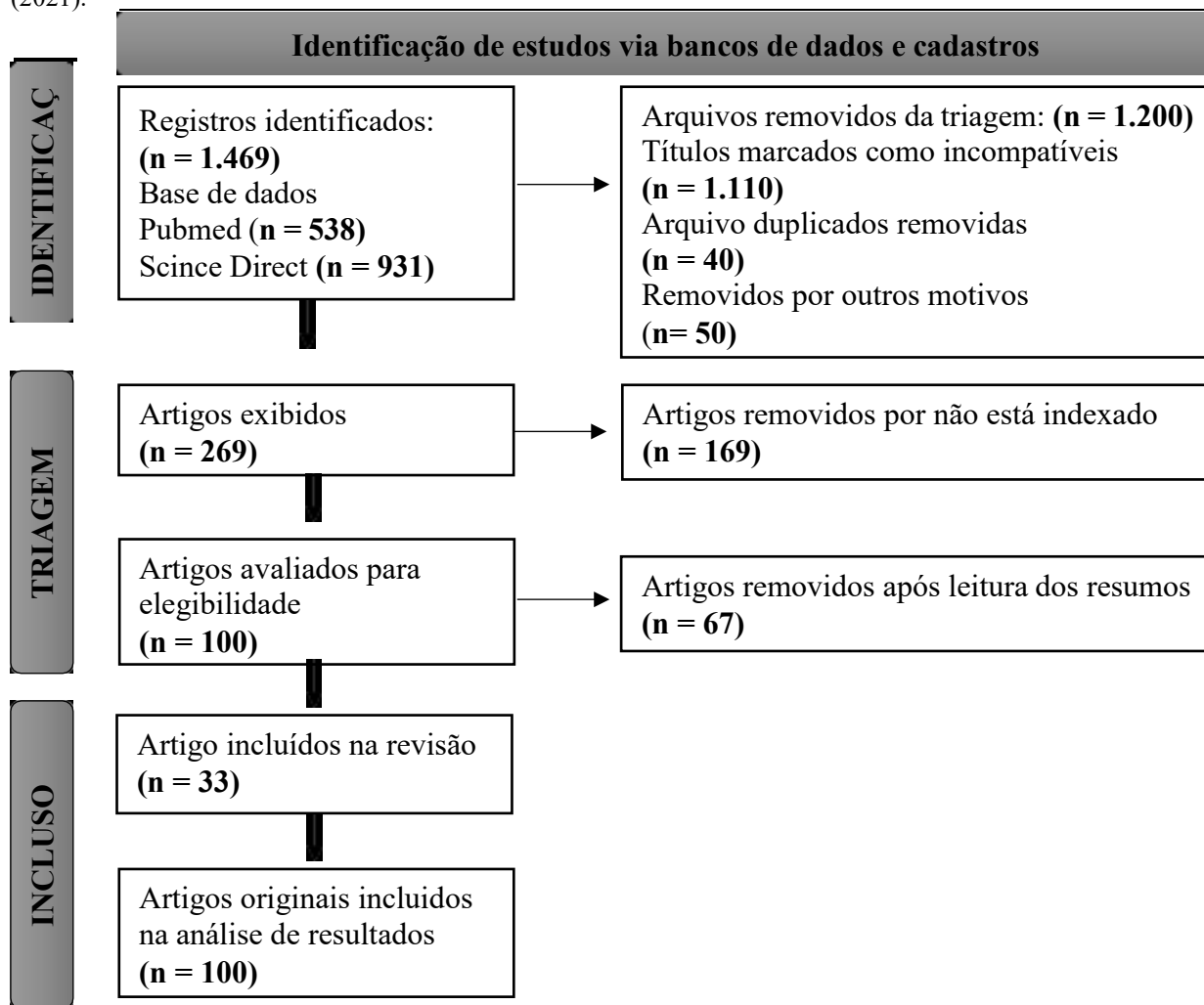
Com as informações separadas e agrupadas por atividade e ação inflamatória, a análise não paramétrica McNemar feita através do *software* Jamovi, apresentou a tabela de contingência **(Tabela 1)** correlacionando os perfis de 21 moléculas, e o resultado de p feita por equações matemáticas na **(Tabela 2)**. Após a leitura dos artigos selecionados, foram extraídas as informações de interesse **(Quadro 1, 2 e 3)**.

Tabela 1 Tabela de contingência de amostras pareadas. Nas linhas as tendências moleculares e nas colunas as atividades neurotóxicas correspondentes.

PRÓ-INFLAMATÓRIA	ATIVIDADE NEUROTÓXICA		Total
	NÃO	SIM	
NÃO	9	0	9
SIM	10	2	12
Total	19	2	21

Tabela 2 Teste de McNemar com valor de P = 0,002.

	Valor	df	p
χ^2	10.0	1	0.002
N	21		

Figura 2 Fluxograma de seleção de estudos por processo de pesquisa sistemática de acordo com o Grupo PRISMA (2021).

Todos os estudos selecionados para os resultados e discussão deste artigo, retratam sobre as moléculas pró e anti-inflamatórias, dentre elas, citocinas, quimiocinas, interleucinas, neurotrofinas e fatores de transcrição, reguladas e secretadas pelos astrócitos, células envolvidas na neuroinflamação, ora com estímulo neuroprotetor e ora com estímulo neurotóxico. Os artigos possuem o seu objetivo, tal como os instrumentos utilizados na coleta de dados evidenciando a sua qualidade metodológica, além disso, cada artigo apresenta no mínimo uma molécula envolvida na neuroinflamação, a fim de avaliar a probabilidade dessas células gliais, influenciar positivamente ou negativamente no processo neuroinflamatório.

Quadro 1 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Interleucinas.

AUTORES	TÍTULO	MÉTODO	CONCLUSÕES
SÉNÉCAL et al., (2016)	Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses	Estudo experimental	No presente estudo foi utilizado uma imunocoloração de amostras de cérebro humano. Os achados demonstraram que a IL-27 estava elevada em lesões de Esclerose Múltipla, enquanto astrócitos exibiam um aumento do receptor de IL-17 assim como de MHC classe 1. Por apresentarem esse perfil dependente de IL-17, astrócitos podem influenciar não apenas as respostas inflamatórias periféricas, mas também locais no cérebro de pacientes com EM.
YOU et al., (2017)	IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling	Estudo experimental	No presente estudo foi ilustrado que a IL-17 tem a capacidade de modular a expressão de VEGF ativando a via de sinalização JAK / STAT <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , o que promoverá ainda mais a ativação de astrócitos e fornecerá uma melhor compreensão da lesão da medula espinhal. Na investigação a IL-17 induziu a expressão de VEGF na lesão da medula espinhal, alterando significativamente a preservação do tecido e os volumes residuais de urina e a integridade da barreira sanguínea da medula espinhal <i>in vivo</i> .
LIU et al., (2018)	Analysis of Long Noncoding RNA and mRNA Expression Profiles in IL-9-Activated Astrocytes and EAE Mice	Estudo Experimental	No presente estudo foi realizado uma análise de lncRNAs e mRNAs de tecidos cerebrais de camundongos com EAE e astrócitos primários de camundongos tratados com IL-9. Foi revelado que os perfis dessa expressão de lncRNAs e mRNAs <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> pode ajudar a delinear mecanismos de ativação de astrócitos durante o processo de MS / EAE.
TOUIL et al., (2018)	Human central nervous system astrocytes support survival and activation of B cells: implications for MS pathogenesis	Estudo experimental	No presente estudo foi avaliado se os fatores solúveis liberados pelos astrócitos humanos podem afetar a sobrevivência e a ativação das respostas das células B que possa propagar respostas inflamatórias compartimentadas no SNC. Foi descoberto um mecanismo em potencial que a partir da inflamação promove a proliferação de células B, desempenhando um papel importantes na doença progressiva.
ZHANG et al., (2019)	Interleukin-11 treatment protected against cerebral ischemia/reperfusion injury	Estudo experimental	No presente estudo foi investigado os efeitos da IL-11 na lesão de isquemia cerebral e foi identificado que a expressão de mRNA e proteína de IL-11 diminuiu significativamente após isquemia cerebral, além disso, a IL-11 reduzir o dano neuropático, a ativação glial e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a expressão de citocinas anti-inflamatórias.
THELIN et al., (2020)	Delineating Astrocytic Cytokine Responses in a Human Stem Cell Model of Neural Trauma	Estudo experimental	No presente estudo teve como objetivo investigar <i>in vitro</i> culturas de astrócitos humanos a respostas de citocinas em uma concentração aproximada das consequências de lesão cerebral traumática em humanos. Essas culturas de astrócitos geraram um aumento na produção de citocinas em particular a IL-1 β .

Quadro 2 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Fatores de transcrição e neurotrofinas.

AUTORES	TÍTULO	MÉTODO	CONCLUSÕES
PALARETI et al., (2016)	SHH signalling mediates astrocyte crosstalk with neurons to confer neuroprotection.	Estudo experimental	No presente estudo foi utilizado camundongos suíços fêmeas com acasalamento temporizado e foi obtido resultados sugestivos em que a redução na reatividade dos astrócitos causada por SHH pode influenciar diretamente a sobrevivência neuronal.
WEISE et al., (2018)	TGFβ-signaling and FOXG1-expression are a hallmark of astrocyte lineage diversity in the murine ventral and dorsal forebrain	Estudo experimental	No presente estudo foi aplicado técnica de proteômica quantitativa de células neurais do telencéfalo de camundongos portadores de uma deleção de TGFBR2 e foi identificado que proteínas específicas para astrócitos foram alteradas e além disso, o rastreamento de linhagem revelou que os subtipos de astrócitos derivaram parcialmente de células precursoras neurais que expressam FOXG1.
ZHOU et al., (2019)	Astrocytes-derived VEGF exacerbates the microvascular damage of late delayed RBI	Estudo experimental	No presente estudo foi investigado o papel do VEGF e o seu mecanismo no dano microvascular em RBI, camundongos do tipo selvagem e camundongos transgênicos com superexpressão de VEGF derivado de astrócitos. Esses dados revelam que a expressão de VEGF e Ang-2 está intimamente associada à lesão microvascular.
FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., (2020)	Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy	Estudo experimental	No presente estudo foram utilizados camundongos, com o objetivo de estudar o papel da neurotrofina produzida por astrócitos. Foi provado que a BDNF aumenta a sua ativação e toxicidade neuronal, além de apontar uma possível supregulação astrocítica pró-BDNF na modulação de processos neurodegenerativos.

Quadro 3 Características dos estudos sobre astrócitos na neuroinflamação datadas entre 2016 à 2021. Subtipo molecular: Quimiocinas, citocinas e outros fatores.

AUTORES	TÍTULO	MÉTODO	CONCLUSÕES
LIU et al., (2016)	Cathepsin D is involved in the oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis of astrocytes	Estudo Experimental	No presente estudo foram examinados os efeitos de moléculas inflamatórias na morte induzida de astrócitos a fim de identificar uma nova estratégia para o tratamento de danos cerebrais. As moléculas TNF- α e FasL reforçou a expressão da proteína apoptótica catepsina D.
LUO et al., (2016)	Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain	Estudo Experimental	No presente estudo foi utilizado dois modelos de camundongos em dor neuropática. Baseado nisso foi demonstrado uma ligação entre a CXCL12 e a CXCR4 na patogênese da dor, trazendo excelentes informações para uma futura terapia na neuropatia.
JIN et al., (2018)	Astrocyte-derived CCL20 reinforces HIF-1-mediated hypoxic responses in glioblastoma by stimulating the CCR6-NF- κ B signaling pathway	Estudo experimental	No presente estudo foi examinado se os astrócitos afetam a adaptação das células do glioblastoma à hipóxia. Em comparação com os tumores de controle, os xenoinxertos de glioblastoma deficientes em CCR6 cresceram mais lentamente. Esses resultados sugerem que as células de glioblastoma se adaptam bem ao estresse hipóxico em virtude do CCL20 derivado de astrócitos vizinhos.
ORIA et al., (2018)	CD200-CD200R imbalance correlates with microglia and pro-inflammatory activation in rat spinal cords exposed to amniotic fluid in retinoic acid-induced spina bifida	Estudo experimental	No presente estudo usou um modelo de rato de espinha bífida induzido por ácido retinóico, que quando exposto ao líquido amniótico, apresentava uma astrogliose progressiva com perda neuronal em comparação às medulas espinhais não expostas. As novas evidências é que a ativação microglial e a interrupção do CD200-CD200R, pode participar na patogênese da espinha bífida até o final da gestação.
SAMIDURAI et al., (2020)	Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) Enhances Activation of STAT3/NLRC4 Inflammasome Signaling Axis through PKC δ in Astrocytes: Implications for Parkinson's Disease	Estudo experimental	No presente estudo foi examinado os eventos de sinalização celular ao estado de ativação astrogliosa induzido por TWEAK e sua relação com a patologia semelhante a Doença de Parkinson. O aumento dessa molécula em astrócitos reativos correlacionou positivamente com ativação de inflamassomas, concomitante com a perda de neurônios.
SMITH et al., (2020)	The impact of regional astrocyte interferon- γ signaling during chronic autoimmunity: A novel role for the immunoproteasome	Estudo experimental	No presente estudo, foi avaliado um cérebro com esclerose múltipla (EM), e foi analisado os astrócitos humanos regionais primários. Nesse tecido houve uma expressão do imunoproteassoma (iP), no qual foi aumentada na medula espinhal em comparação com o tronco cerebral e uma diminuição do estresse oxidativo. Com isso foi visto o papel protetor do IFN γ na neuroinflamação crônica e a identificação da nova função do iP em astrócitos durante a autoimunidade do SNC

Após a análise dos resultados dos estudos experimentais selecionados no (**Quadro 1, 2, 3**), agrupamos os perfis inflamatórios mediante as moléculas produzidas, reguladas ou expressadas por astrócitos na neuroinflamação para uma melhor análise (**Tabela 3**).

Tabela 3 Moléculas produzidas, reguladas ou expressadas por astrócitos na neuroinflamação.

FONTE	MOLECULAS	ATIVIDADE INFLAMATÓRIA
LIU et al., (2016)	FASL	PRÓ
LUO et al., (2016)	CXCL12	PRÓ
PALARETI et al., (2016)	Shh	ANTI
SÉNÉCAL et al., (2016)	IL-27	ANTI
YOU et al., (2017)	IL17	PRÓ
JIN et al., (2018)	CCL20	PRÓ
LIU et al., (2018)	IL-9	ANTI
ORIA et al., (2018)	CD200	PRÓ
TOUIL et al., (2018)	BAFF	PRÓ
	IL-6	PRÓ
	IL-15	PRÓ
WEISE et al., (2018)	TGFβ	ANTI
ZHANG et al., (2019)	IL-11	ANTI
ZHOU et al., (2019)	VEGF	PRÓ
FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., (2020)	BDNF	ANTI
SAMIDURAI et al., (2020)	TWEAK	PRÓ
SMITH et al., (2020)	IFNγ	PRÓ
THELIN et al., (2020)	IL-4	ANTI
	IL-10	ANTI
	IL-1β	PRÓ
	TNFα	PRÓ

4 DISCUSSÃO

Moléculas expressadas e liberadas pelos astrócitos têm grande relação com a progressão da neuroinflamação (**Tabela 3**). Essas moléculas são definidas em termos imunológicos como DAMPs, desempenhando um papel essencial na promoção de perfis astrocitários e são o ponto-chave na extensão ou interrupção do processo neuroinflamatório (CATORCE; GEVORKIAN, 2016; LIDDELOW et al., 2017; ZHAO et al., 2019; BATISTA et al., 2020).

As moléculas secretadas, expressadas ou mediadas por astrócitos na neuroinflamação reunidas nesse estudo (**Quadro 1, 2 3**), concluem uma positividade para atividade neurotóxica, confirmado por um valor de $p = 0,002$, rejeitando assim a hipótese nula, havendo evidências suficientes para uma hipótese alternativa.

Segundo THELIN et al., (2020), os astrócitos são células essenciais no SNC com propriedades pró e anti-inflamatórias. No seu estudo foi investigado, culturas de astrócitos humanos *in-vitro* e suas respostas ao meio enriquecido com citocinas pró (IL-1 β, IL-6 e TNF) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e foi obtido um aumento na produção de citocinas do tipo IL-1 β. Para LIDDELOW et al., (2017) através da indução do LPS (lipopolissacarídeo), os

astrócitos produziram uma resposta neurotóxica. No seu estudo trouxe como resultado, uma resposta patológica provocada por LPS, causando uma neuroinflamação mediada pela microglia, onde foi secretado C1q, TNF α e IL1- α , desta forma ativando astrócitos em perfil A1. De uma forma muito interessante foi mostrado que ativação de astrócitos é dependente da microglia e que o perfil A1 é ativado em astrócitos principalmente através dessas três moléculas.

TOUIL et al., (2018) no entanto, afirmaram que os astrócitos ativados, podem contribuir na sobrevivência de células B, mantendo por mais tempo a resposta de anticorpos, que no fim se torna efetiva na promoção da cicatriz glial. No seu estudo experimental foram utilizados paciente acometidos com EM não tratada, com isso, foram expostos a astrócitos humanos com sinais inflamatórios padrão. Essa exposição induziu a regulação positiva de células B e potencializou a secreção de fatores astrocitários, além disso, apresentou uma neutralização de IL-6, IL-15 e BAFF (ambos fatores pró-inflamatórios) através de uma resposta anti-inflamatória mediada por anticorpos.

ZHANG et al., (2019) demonstraram que os números, bem como a reatividade de astrócitos aumentam em tecidos cerebrais isquêmicos e que a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias estão associadas a respostas neuroinflamatórias induzidas por isquemia e morte neuronal. No seu experimento a IL-11 reduziu o dano neuropático e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Já no estudo de LIU et al., (2018), outra citocina mediada também por astrócitos, foi a IL-9, onde teve uma ação anti-inflamatória, aumentando a produção de quimiocinas para facilitar o recrutamento de células T para o SNC, possibilitando maior resposta de reparo ao dano tecidual.

Em uma investigação feita por YOU et al., (2017), afirmaram que astrócitos ativados beneficiam e regulam a formação de cicatrizes gliais, prologando o processo inflamatório até a conclusão da mesma. No seu estudo a IL-17 induziu astrócitos reativos, consequentemente preservando o tecido e a integridade da barreira medular espinhal, através da modulação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) dependente de astrócitos. SÉNÉCAL et al., (2016), verificaram a contribuição da IL-17 na modulação das respostas imunes em pacientes com EM, onde a mesma pode modular as propriedades imunológicas dos astrócitos e células do sistema imunológico infiltrante, para um perfil protetor.

ZHOU et al., (2019) relatou que a superexpressão do VEGF derivado de astrócitos atua como intermediário entre as citocinas e a lesão microvascular, estando intimamente associada à progressão da lesão. FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., (2020) no que lhe concerne, traz a molécula BDNF derivada de astrócitos como alvo terapêutico promissor, relatando um aumento

e ativação neuronal, beneficiando a comunicação diante da modulação de processos neurodegenerativos, tendo como principal atividade a redução de neurotoxicidade e o aumentando da sobrevivência neuronal.

Segundo SMITH et al., (2020) o IFN γ é extremamente patogênico em condições imunossupressoras, porém a sinalização dessa molécula em astrócitos durante a EM tem propriedades protetoras, induzindo reatividade benéfica com promoção de remielinização e resgate de macrófagos e microglias para limpeza de debris celulares. Para WEISE et al., (2018), outra sinalização importante é a desempenhada pela molécula TGF β (fator de crescimento transformador beta), diminuindo gliose mas induzindo um perfil glial anti-inflamatório e reduzindo dano. Outro estudo que adiciona mais um fator na heterogeneidade de astrócitos frente as doenças neurodegenerativas foi o de SAMIDURAI et al., (2020), avaliando em animais a disfunção astrocitária na Doença de Parkinson (DP). Foi encontrado que o indutor de apoptose do tipo fator de necrose tumoral (TWEAK) é o regulador chave da reatividade astrocitária neurotóxica e podendo influenciar na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em DP.

Para LIU et al., (2016) FasL, uma proteína ligante está envolvida na apoptose celular, e altas concentrações dessa molécula pode promover a disfunção lisossomal e o extravasamento de Catepsina D para o citoplasma, neste sentido astrócitos com alta expressão de GFAP (características de astrócitos A1) parecem ter relação direta com a liberação dessa molécula, beneficiando o dano. No estudo feito por PALARETI et al., (2016), avaliaram a Shh, uma glicoproteína bastante relacionada com desenvolvimento e proliferação neuronal e glial em zonas neurogênicas do cérebro e que também é expressa após lesão cerebral como forma de resposta regenerativa. O mesmo afirma, que essa molécula durante o dano tem a capacidade de regulação astrocitária, e está envolvida na recuperação da sinalização neuronal, representando um mecanismo neuroprotetor dependente de astrócitos.

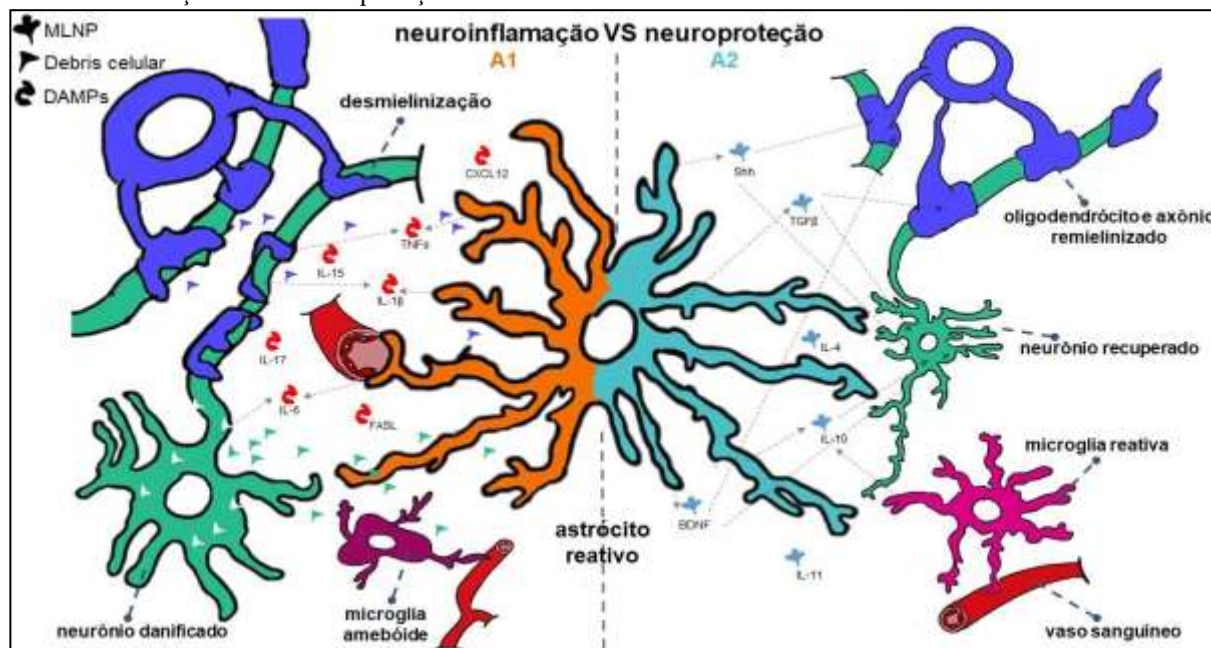
Para LUO et al., (2016) a quimiocina CXCL12 expresso em astrócitos é um modulador de dor, muito envolvido na dor neuropática e tem relação com mecanismos de dano axonal e de mielina em processos neuroinflamatórios, tendo também relação com reatividade glial. Já em JIN et al., (2018) a quimiocina CCL20 secretadas por astrócitos, em um estudo sobre glioblastomas, induziu um crescimento reduzido das células cancerosas por conta da sua via de sinalização, integrada a reatividade glial indutora de dano. ORIA et al., (2018) por sua vez, fizeram um estudo sobre o desequilíbrio da glicoproteína CD200 em astrogliose medular, onde essa molécula participou da patogênese, demonstrando assim, a indução neuroinflamatória mediada por células gliais.

No geral, a reatividade glial ainda continua sendo um grande mistério possuindo diversas lacunas a serem respondidas. Além disso, quando dito sobre a sua reatividade encontramos uma grande limitação de estudos e de respostas concretas. Contudo, visto que em nosso estudo sistemático a astroglia teve uma tendência a citotoxicidade, e consequentemente uma capacidade de impulsionar o processo neuroinflamatório, é nítido a capacidade de plasticidade que a astroglia possui, desempenhando papéis distintos quando expostos a fatores moleculares e fisiológicos diferentes.

Em resumo, o astrócito desempenha mecanismos moleculares diversos quando reativos, podendo ser neuroinflamatório ou neuroprotetor (**Figura 3**). Foi observado em vários estudos aqui reunidos que quando reativo em perfil A1 o mesmo agrava o processo neuroinflamatório, podendo causar até uma degeneração, caso esse perfil module por um tempo prolongado as moléculas pró-inflamatórias (CXCL12, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, FASL, entre outras). Já no perfil A2, como visto anteriormente, essa célula tem a capacidade de remielinização e de reparo neuronal através da mediação de subtipos moleculares, dentre elas interleucinas, fatores tróficos e neurotrofinas (IL-4, IL-10, IL-11, SHH, TGF β e BDNF).

Nesse contexto, outros estudos de alto nível deve ser realizados, simulando outras condições de ambientes e utilizando a expressão de outras moléculas aqui não citadas. Dito isso, a resposta astrocitária em frente a neuroinflamação ainda necessita de um delineamento preciso para que futuramente seja possível a regressão e inibição do processo neuroinflamatório e da modulação de moléculas pró-inflamatórias.

Figura 3 Graphical abstract: Mecanismos moleculares desempenhados por astrócitos reativos em perfil A1 e A2 na neuroinflamação versus neuroproteção.



Astrócitos reativos em perfil A1/neurotóxico desempenham papel degenerativo principalmente através da produção de moléculas pró-inflamatórias como CXCL12, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, FASL entre outras, gerando desmielinização e degeneração neuronal. Em contrapartida astrócitos de perfil A2/neuroprotetor parcialmente geram reparo neuronal e remielinização através da liberação de interleucinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-11, Fatores tróficos e neurotrofinas como SHH, TGF β e BDNF. Fonte: (LIDDELOW et al., 2017; JOSHI et al., 2019; SAMIDURAI et al., 2020; SOFRONIEW, 2020).

5 CONCLUSÃO

Mediante análise dos materiais utilizados no presente estudo, conclui-se que os astrócitos são células de extrema relação com a neuroinflamação, podendo expressar um perfil do tipo A1 (causando danos ao SNC, liberando moléculas pró-inflamatórias, inferindo no fornecimento nutricional aos neurônios) ou um perfil A2 (secretando moléculas anti-inflamatórias, promovendo neurogênese e participando de vias de regulação, além de suporte trófico, metabólico e reparador). Contudo, esse estudo trouxe algumas moléculas de centenas que são reguladas, mediadas e secretadas pelos astrócitos, para tentar entender a sua participação na neuroinflamação em diversas patologias que acometem o SNC. Desta forma obtivemos uma tendência astrocitária de neurotoxicidade. Estudos futuros serão necessários para verificar a heterogeneidade dessas células em relação a outras moléculas assim como outros fenótipos astrocitários.

REFERÊNCIAS

- BLANCO-SUAREZ, E. et al. Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors. **Neuron**, v. 100, n. 5, p. 1116- 1132.e13, 2018.
- BOZIC, I.; SAVIC, D.; LAVRNJA, I. **Astrocyte phenotypes: Emphasis on potential markers in neuroinflammation**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 2020.
- DE SOUSA, A. A.; BRAGA, S. A.; SOBRINHO, H. M. DA R. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Estudos**, v. 43, n. 1, p. 79, 2016.
- ESCARTIN, C. et al. **Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions** *Nature Neuroscience*, 15 mar. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41593-020-00783-4>>
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, S. et al. Astrocytic BDNF and TrkB regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 6, 2020.
- GUERRERO-GARCÍA, J. J. The role of astrocytes in multiple sclerosis pathogenesis. **Neurologia**, v. 35, n. 6, p. 400–408, 2020.
- JIN, P. et al. Astrocyte-derived CCL20 reinforces HIF-1-mediated hypoxic responses in glioblastoma by stimulating the CCR6-NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, v. 37, n. 23, p. 3070–3087, 14 jun. 2018.
- JOSHI, A. U. et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1635–1648, 2019.
- KHAKH, B. S.; DENEEN, B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 42, p. 187–207, 2019.
- LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.
- LIU, J. et al. Cathepsin D is involved in the oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis of astrocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 1257–1263, out. 2016.
- LIU, X. et al. Analysis of Long Noncoding RNA and mRNA Expression Profiles in IL-9-Activated Astrocytes and EAE Mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1986–1998, 2018.

- LUO, X. et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 12, p. 174480691663638, 8 jan. 2016.
- MATIAS, I.; MORGADO, J.; GOMES, F. C. A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–18, 19 mar. 2019.
- ORIA, M. et al. CD200-CD200R imbalance correlates with microglia and pro-inflammatory activation in rat spinal cords exposed to amniotic fluid in retinoic acid-induced spina bifida. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10638, 13 dez. 2018.
- PAGE, M. J. et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. **BMJ**, v. 372, p. n160, 29 mar. 2021.
- PALARETI, G. et al. SHH signalling mediates astrocyte crosstalk with neurons to confer neuroprotection. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 12 fev. 2016.
- PONATH, G.; PARK, C.; PITT, D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2018.
- REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. Glia of the human retina. **Glia**, v. 68, n. 4, p. 768–796, 3 abr. 2020.
- SAMIDURAI, M. et al. Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) Enhances Activation of STAT3/NLRP4 Inflammasome Signaling Axis through PKC δ in Astrocytes: Implications for Parkinson's Disease. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1831, 4 ago. 2020.
- SÉNÉCAL, V. et al. Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses. **Glia**, v. 64, n. 4, p. 553–569, abr. 2016.
- SMITH, B. C. et al. The impact of regional astrocyte interferon- γ signaling during chronic autoimmunity: A novel role for the immunoproteasome. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2020.
- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.
- TEIXIDÓ, J.; HIDALGO, A.; FAGERHOLM, S. Editorial: Leukocyte Trafficking in Homeostasis and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. November, p. 1–3, 2019.
- THAWKAR, B. S.; KAUR, G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/Caspase 1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage

Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 326, n. November 2018, p. 62–74, 2019.

THELIN, E. P. et al. Delineating Astrocytic Cytokine Responses in a Human Stem Cell Model of Neural Trauma. **Journal of Neurotrauma**, v. 37, n. 1, p. 93–105, 1 jan. 2020.

THELL, K. et al. Oral activity of a nature-derived cyclic peptide for the treatment of multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 15, p. 3960–3965, 2016.

TOUIL, H. et al. Human central nervous system astrocytes support survival and activation of B cells: implications for MS pathogenesis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 114, 19 dez. 2018.

WEISE, S. C. et al. TGF β -signaling and FOXG1-expression are a hallmark of astrocyte lineage diversity in the murine ventral and dorsal forebrain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. November, p. 1–16, 2018.

WESTERGARD, T.; ROTHSTEIN, J. D. Astrocyte Diversity: Current Insights and Future Directions. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 6, p. 1298–1305, 2020.

YOU, T. et al. IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 41779, 10 mar. 2017.

ZHANG, B. et al. Interleukin-11 treatment protected against cerebral ischemia/reperfusion injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 115, n. May 2018, p. 108816, jul. 2019.

ZHOU, D. et al. Astrocytes-derived VEGF exacerbates the microvascular damage of late delayed RBI. **Neuroscience**, v. 408, p. 14–21, jun. 2019.

ANEXOS

ANEXO A Revista para publicação European Journal of Neuroscience (EJN).



EJN European Journal of Neuroscience **FENS** Federation of European Neuroscience Societies

CASA | CERCA DE ▾ | CONTRIBUIR ▾ | NAVEGAR ▾

Tratamento, revisão e publicação de manuscritos EJN

Webinar FENS Friday Friday com o Editor-Chefe e Editores Sênior da EJN

Iniciativas de pesquisa aberta ▾

Tipos de artigo

Tipo de Artigo	Descrição	Resumo / estrutura de limite de palavras	Outros requerimentos

Fonte: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14609568/homepage/forauthors.html2#>

ANEXO B Normas da revista: Resumo de no mínimo 250 palavras para artigo de revisão.

	significativamente para o conhecimento.	não estruturado	texto são necessários. Inclua a declaração ética se o estudo envolver experimentos com animais ou humanos.
Artigo de edição especial	Artigos de edições especiais são formatados e considerados da mesma forma que 'relatórios de pesquisa'	Resumo - 250 palavras, não estruturado	Declaração de disponibilidade de dados, declaração de conflito de interesses, declaração de contribuições do autor, resumo gráfico e texto
Artigo de revisão	As resenhas na EJM são artigos completos sobre tópicos de particular interesse atual. Isso inclui revisões críticas da literatura, incluindo revisões sistemáticas e meta-análises.	Resumo - 250 palavras, não estruturado	Declaração de conflito de interesses, declaração de contribuições do autor, resumo gráfico e texto
Revisão de edição especial	A revisão de uma edição especial é formatada e considerada da mesma forma que o 'Artigo de Revisão'.	Resumo - 250 palavras, não estruturado	Declaração de disponibilidade de dados, declaração de conflito de interesses, declaração de contribuições do autor, resumo gráfico e texto
Comunicações Curtas	Deve relatar um avanço significativo no campo e deve representar um estudo 'completo' ao invés de observações preliminares.	Limite de 3500 palavras Máximo de 4 figuras e 2 tabelas. Resumo - sem limite de palavras, estruturado	A contagem total de palavras deve ser indicada na página de título. Desencorajamos fortemente o uso de material suplementar. Os manuscritos que não estiverem em conformidade com essas diretrizes podem ser devolvidos aos autores ou reclassificados como um Relatório de Pesquisa padrão. COI, agradecimentos, contribuições do autor, figuras e legendas das figuras, resumo gráfico e texto e declaração de disponibilidade de dados são obrigatórios. O resumo

Fonte: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14609568/homepage/forauthors.html#>

ANEXO C Normas da revista: A revista EJM usa a submissão em formato livre.

Envio em formato livre

A EJM usa a submissão em formato livre (anteriormente chamado de 'seu artigo do seu jeito') para um processo de submissão simplificado e agilizado.

É importante observar que os manuscritos deverão ser submetidos de acordo com as diretrizes do autor na fase de revisão. Se o seu manuscrito não incluir a mudança de formato solicitada e duas cópias do manuscrito (uma cópia limpa e outra com alterações marcadas sem alterações rastreadas), o escritório editorial o enviará de volta para revisão.

Formato livre - antes de enviar

Antes de enviar, você precisará de:

Seu manuscrito: pode ser um único arquivo incluindo texto, figuras e tabelas ou arquivos separados - o que você preferir. Todas as seções necessárias devem estar contidas em seu manuscrito, incluindo resumo, introdução, métodos, resultados e conclusões. Figuras e tabelas devem ter legendas. As referências podem ser submetidas em qualquer estilo ou formato, desde que sejam consistentes ao longo do manuscrito. Se o manuscrito, figuras ou tabelas forem difíceis de ler, também serão difíceis para os editores e revisores. Se o seu manuscrito for difícil de ler, a redação pode enviá-lo de volta para revisão.

Fonte: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14609568/homepage/forauthors.html2#>