

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Departamento de Nutrição

Allana Von Sulzback Brasil

**EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO EM
CAENORHABDITIS ELEGANS: EFEITO PROTETOR DA LUTEÍNA**

Porto Alegre

2017

Allana Von Sulzback Brasil

**EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO EM
CAENORHABDITIS ELEGANS: EFEITO PROTETOR DA LUTEÍNA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Nutrição.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Paula Rossini Augusti

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Brasil, Allana Von Sulzback Brasil
EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM PARÂMETROS DE DANO
OXIDATIVO EM CAENORHABDITIS ELEGANS: EFEITO PROTETOR
DA LUTEÍNA / Allana Von Sulzback Brasil Brasil. --
2017.
54 f.
Orientadora: Paula Rossini Augusti.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Antioxidantes. 2. Cianotoxinas. 3. Radicais
livres. 4. Carotenoides. I. Augusti, Paula Rossini,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA
ALLANA VON SULZBACK BRASIL

EFEITO DA MICROCISTINA-LR EM PARÂMETROS DE DANO OXIDATIVO EM
***CAENORHABDITIS ELEGANS*: EFEITO PROTETOR DA LUTEÍNA**

Trabalho de conclusão de curso, requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Departamento de Nutrição:

Porto Alegre, 18 de Dezembro de 2017.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso elaborado por Allana Von Sulzback Brasil, como requisito parcial para a obtenção de grau em Bacharel em Nutrição.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Juliane Elisa Welke (UFRGS)

Prof^a. Dr^a Ana Carolina Ritter (UFRGS)

Prof^a. Dr^a Paula Rossini Augusti – Orientadora

AGRADECIMENTOS

Primordialmente agradeço aos meus pais, Luiz e Mara, que sempre fizeram o possível e o impossível para me oportunizar a educação e conforto que não tiveram. Gratidão por serem incessantes ao longo de todos os anos da minha vida, incentivando e mostrando-me que a intelectualidade de um ser é a única coisa que jamais poderá ser levada. Mãe, suas palavras, seu cuidado e sua preocupação foram sempre meu acalento. Pai, sua escuta, seu abraço e seu carinho foram os melhores que eu poderia receber todos os dias, obrigada por ser meu confidente e meu melhor amigo. Ao meu irmão Allan que sempre estimulou a criação de um senso crítico apurado e à minha irmã Dyandra pela paciência, parceria e compreensão. Aos meus tios e avós que me afagaram nos momentos ruins e também vibraram comigo nas conquistas.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado me incentivando e auxiliando a deixar tudo mais leve recarregando energias com muita risada. Especialmente à Larissa Salomoni Carpes por ser a melhor amiga que eu poderia ter e se fazer presente nestes 5 anos de graduação, onde pudemos dar as mãos e caminharmos lado a lado compreendendo e apoiando de forma mútua com um amor e paciência sem iguais. À Geórgia Regla e Vanessa Thais Peres Melo, pelo apoio, palavras e amizade. Sem vocês três não seria fácil, na verdade, seria ainda mais difícil.

À minha orientadora, Paula Rossini Augusti, pela receptividade, puxões de orelha e pela propagação de conhecimento, amor pela ciência e descoberta de novos dados. Se hoje trilho este caminho, devo isso a você! Obrigada por me mostrar o quão encantadora pode ser a pesquisa. A todos os colegas, mestres e doutores do Laboratório de Compostos bioativos, do Laboratório de Toxicologia de Alimentos do ICTA e do Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia, que me permitiram aprender e me desenvolver tanto pessoal como profissionalmente ao longo desses anos de convívio.

Às instituições de fomento, que mesmo na situação deplorável da ciência do país, encontram forças e esgotam recursos para que o processo de pesquisa continue. E por fim, à UFRGS, seus docentes e demais colaboradores, sem vocês não seria possível.

RESUMO

O aumento da atividade urbana e industrial, concomitante ao aumento de temperatura, geram um processo denominado eutrofização dos sistemas aquáticos. Tal processo tem como principal consequência a rápida proliferação de cianobactérias no ambiente aquático, conhecida como “floração” ou “bloom”. Algumas espécies de cianobactérias têm a capacidade de produzir metabólitos secundários que geram sabor e odor desagradáveis à água, além de produzir poderosas toxinas (cianotoxinas). Tais cianotoxinas causam graves injúrias a animais terrestres, aquáticos e humanos, através da ingestão ou contato com a água contaminada e/ou alimentos irrigados com a mesma. As microcistinas (MIC) são as cianotoxinas mais comumente encontradas em florações e levam a uma por hemorragia hepática, sendo seus mecanismos de toxicidade ligados ao estresse oxidativo. Neste trabalho avaliou-se o efeito de doses ambientalmente importantes de MIC-LR sobre marcadores de estresse oxidativo e taxa de sobrevivência no nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), um modelo alternativo ao uso de animais de experimentação. Foi investigado, adicionalmente, o possível efeito protetor do carotenoide luteína (LUT). Pétalas de *Tagetes* foram utilizadas para obtenção da LUT, sendo o grau de pureza, verificado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foram utilizadas cepas de *C. elegans* mantidas a 20° C com *E. Coli* em meio de crescimento NGM. No processo de tratamento empregaram-se larvas hermafroditas gravídicas para realização da sincronização e posterior eclosão de ovos. Os nematoides foram tratados com MIC-LR nas concentrações de 1, 10, 100, 250 e 500 µg/L e separadamente com LUT nas concentrações de 5, 10, 50, 100 e 250 µM por 30 minutos a 20°C. Em seguida, os nematoides foram submetidos às análises de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador de peroxidação lipídica, bem como expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Adicionalmente foram avaliados taxa de sobrevivência e área corporal dos nematoides. Os nematoides foram pré-expostos a LUT 5µM (concentração não tóxica) durante 30 minutos e após, expostos a MIC-LR 500 µg/L (concentração que induziu maior toxicidade) por 30 minutos a 20°C. Os resultados indicaram que concentrações de 1-100 µg/L não causaram alterações significativas na área corporal, taxa de sobrevivência e geração

de EROs. Entretanto, todas as concentrações de MIC-LR mostraram-se diferentes do controle na expressão de SOD. Somente as concentrações de 250 e 500 µg/L foram diferentes do controle quanto a taxa de sobrevivência e geração de EROS. Para expressão de CAT, somente a concentração de 500 µg/L mostrou-se diferente do controle. A LUT extraída apresentou pureza de 92% e foi capaz de prevenir os danos causados pela MIC-LR na geração de EROs, taxa de sobrevivência e expressão da CAT. O pré-tratamento com LUT não foi capaz de prevenir as alterações causadas na expressão da SOD. Estes dados sugerem que a MIC-LR, uma conhecida hepatotoxina, exerce toxicidade mesmo em um invertebrado desprovido de fígado e que eventos oxidativos estão envolvidos nessa resposta. O carotenoide LUT preveniu os danos oxidativos causados pela MIC-LR e aparece como uma alternativa para mitigar os efeitos desta intoxicação.

Palavras-chave: antioxidantes; cianotoxinas; radicais livres; carotenóides.

ABSTRACT

The increase of urban and industrial activity, concomitant with the increase in temperature, generate a process called eutrophication of aquatic systems. Such a process has as its main consequence the rapid proliferation of cyanobacteria in the aquatic environment, known as "bloom" or "bloom". Some species of cyanobacteria have the ability to produce secondary metabolites that generate unpleasant taste and odor of water, and produce powerful toxins (cyanotoxins). Such cyanotoxins cause severe injury to terrestrial, aquatic and human animals through ingestion or contact with contaminated water and/or food irrigated with it. Microcystins (MICs) are the cyanotoxins most commonly found in blooms and lead to hepatic hemorrhage, and their mechanisms of toxicity are linked to oxidative stress. In this work the effect of environmentally important doses of MIC-LR on oxidative stress markers and survival rate in the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), an alternative model to the use of experimental animals, was evaluated. Additionally, the possible protective effect of carotenoid lutein (LUT) was investigated. Tagetes petals were used to obtain the LUT, being the degree of purity, verified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Strains of *C.elegans* maintained at 20 °C with *E. coli* in NGM growth medium were used. In the treatment process, gravid hermaphrodite larvae were used for synchronization and later egg hatching. The nematodes were treated with MIC-LR at concentrations of 1, 10, 100, 250 and 500 µg/L and separately with LUT at concentrations of 5, 10, 50, 100 and 250 µM for 30 minutes at 20 ° C. Then, the nematoids were submitted to analyzes of generation of reactive oxygen species (ROS), levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as indicators of lipid peroxidation, as well as expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In addition, the survival rate and body area of the nematodes were evaluated. The nematoids were pre-exposed to 5 µM LUT (non-toxic concentration) for 30 minutes and then exposed to MIC-LR 500 µg / L (concentration which induced increased toxicity) for 30 minutes at 20 °C. The results indicated that concentrations of 1-100 µg/L did not cause significant changes in body area, survival rate and generation of ROS. However, all MIC-LR concentrations were found to be different from the control in SOD expression. Only the concentrations of 250 and 500 µg/L were different from the control for survival rate and EROS generation. For CAT expression, only the concentration of 500 µg/L

was different from the control. The extracted LUT showed 92% purity and was able to prevent damage caused by MIC-LR in the generation of EROs, survival tissue and CAT expression. Pretreatment with LUT was not able to prevent alterations caused in SOD expression. These data suggest that MIC-LR, a known hepatotoxin, exert toxicity even in a liver-depleted invertebrate and that oxidative events are involved in this response. The carotenoid LUT prevented oxidative damage caused by MIC-LR and appears as an alternative to mitigate the effects of this intoxication.

Keywords: antioxidants; cyanotoxins; free radicals; carotenoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Manancial de água doce em processo de eutrofização.....	15
Figura 2. Estrutura química geral de MIC.....	16
Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo.....	18
Figura 4. Ciclo de vida do nematóide <i>C. elegans</i> com detalhamento de estágios larvais.....	20
Figura 5. Estrutura química de LUT.....	22
Figura 6. <i>Tagetes</i> , comumente conhecida como cravo-de-defunto.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

C. elegans – *Caenorhabditis elegans*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DL₅₀ – Dose letal 50

DCFH-DA – Dicloro-fluoroceína diacetato

DMSO - Dimetilsulfóxido

E. Coli – *Escherichia Coli*

EROS – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

LUT – Luteína

MIC – Microcistina

MIC-LR – Microcistina - LR

SOD – Superoxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE SÍMBOLOS

\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
$>$	Maior
$<$	Menor
\pm	Mais ou menos
g	Gramas
Kcal	Quilocalorias
μg	Microgramas
L	litro
mg	Miligramas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1. CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS	14
1.2. ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS INTOXICAÇÕES POR MIC	17
1.3. <i>C. ELEGANS</i> COMO MODELO ALTERNATIVO PARA USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	19
1.4. ANTIOXIDANTES NA TERAPÊUTICA DE INTOXICAÇÕES POR MIC	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. APRESENTAÇÃO.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
5. CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	36
ANEXO I – NORMAS DA REVISTA DE PUBLICAÇÃO.....	44

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Cianobactérias e cianotoxinas*

Sendo a água um elemento essencial à vida, seu acesso de forma qualitativa e quantitativamente suficiente está diretamente relacionado à vitalidade da população. Um dos maiores problemas de saúde pública atual está relacionado com a ingestão de água contaminada em decorrência do esgotamento de recursos hídricos potáveis e contaminação dos mananciais de abastecimento público (Ministério da Saúde, 2003). Para a Organização Mundial da Saúde, as mortes por doenças transmitidas pela água chegam a afetar 25 milhões de pessoas (OMS, 2011). Sabe-se ainda que no Brasil a baixa qualidade dos serviços de tratamento de águas e esgotos em regiões de altas concentrações urbanas e áreas rurais coincidem com a elevação das atividades humanas fazendo com que haja uma utilização aumentada de diversos recursos hídricos como: abastecimento público, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e aquicultura. Todos estes acabam por impactar tanto na quantidade quanto na qualidade da água (Ministério da Saúde, 2003). Alguns especialistas ainda indicam problemas e processos que são base para a crise hídrica: desequilíbrio no binômio disponibilidade-demanda, mudanças globais com eventos hidrológicos, falta de sustentabilidade ambiental e má gestão dos recursos hídricos pelo governo (Tundisi *et al.*, 2008). Ainda, o Brasil possui em torno de 24 milhões de lares residências que até então não possuem acesso aos serviços de saneamento, perfazendo 34,7% de famílias do país (IBGE, 2010).

Com as mais diversas intercorrências de aumento das atividades urbanas, industriais e também com o aumento das temperaturas médias em decorrência do efeito estufa avassalador, ocorrem processos de eutrofização que culminam em ocorrências de florações (Figura 1), ou seja, um incremento dos processos naturais da produção biológica em rios, lagos e reservatórios devido ao enriquecimento artificial desses ecossistemas através do aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados. O descarte de esgoto doméstico e industrial tem sido apontado como um dos principais fatores para que ocorra esse enriquecimento. Sendo assim, o processo eutroficatorio gera uma maior proliferação de algas de forma bastante numerosa, ocasionando na redução da qualidade de água e restringindo a sua utilização o que acaba de se tornar um

problema mundial. Estas florações são comumente comandadas por cianobactérias, que podem ser fixadoras de N_2 (*Anabaena* e *Aphanizomenon* sp) e ainda não fixadoras de N_2 (*Microcystis* e *Planktothrix* sp). São estas cianobactérias responsáveis por gerar metabólitos que produzem sabor ou odor desagradáveis à água e quando em seu crescimento ótimo produzem oligopeptídeos que agem como toxinas, as denominadas cianotoxinas (Wiegand e Pflugmacher, 2005).

Figura 1. Manancial de água doce em processo de floração por *Microcystis* (Fonte: Ministério da Saúde, 2003).



Com a existência e presença das cianotoxinas em águas destinadas ao consumo humano há um incremento nos riscos à saúde pública, considerando-se que as mesmas cianotoxinas são solúveis em água e facilmente se transpõem pelo sistema de tratamento convencional (Brandão e Domingos, 2006). Pode ocorrer também a exposição humana às cianotoxinas através da ingestão de alimentos irrigados com água contaminada ou ingestão de peixes e crustáceos advindos de águas com altos níveis de cianotoxinas. (Drobac *et al.*, 2013). No Brasil, o caso de maior importância e visibilidade de intoxicação por cianotoxinas envolvendo humanos aconteceu em uma clínica de hemodiálise em Caruaru (Brasil) no ano de 1996, onde mais de 65 pacientes renais morreram em decorrência da contaminação da água de diálise por microcistinas (Carmichael *et al.*, 2001). Por fim, o incidente contribuiu para que a cianotoxina microcistina fosse incluída no padrão de

1.2. Envolvimento do estresse oxidativo nas intoxicações por MIC

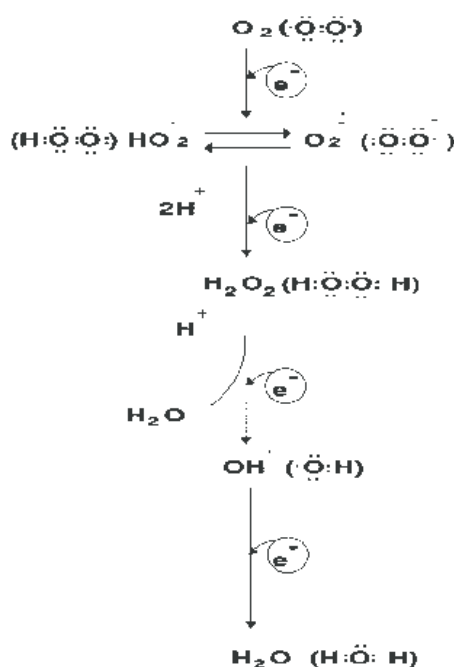
As MICs são hepatotoxinas que causam toxicidade aguda através da inibição das proteínas fosfatases PP1 e 2A, resultando na excessiva fosforilação de proteínas com alteração no citoesqueleto, perda da arquitetura celular com subsequente destruição das células hepáticas causando hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Apesar dos diferentes mecanismos de toxicidade já descritos, alguns extratos de algas contendo MIC-LR também podem aumentar o estresse oxidativo. Isso se dá devido à formação excessiva de EROs que pode ser acompanhada por uma redução na atividade enzimática antioxidante influenciando diretamente nas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GST) (Ding *et al.*, 1998).

Um radical livre ou espécie reativa de oxigênio (ERO) trata-se de uma molécula altamente reativa com um número ímpar de elétrons em sua última camada (sendo isto que lhe confere a alta reatividade) (Ferreira e Matsubara, 1996). São alguns exemplos de radicais livres: oxigênio molecular (O_2), radical hidroxil ($OH\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil ($ROO\cdot$), radical alcóxil ($RO\cdot$) e óxido nítrico ($NO\cdot$), suas gerações podem ser observadas na figura 3 (Aruoma, 1994; Pereira, 1994).

A geração de EROs compreende um mecanismo fisiológico e contínuo, que exerce diversos papéis nos processos metabólicos de diferentes funções biológicas relevantes, como a geração de ATP e o envolvimento no sistema imunológico. Porém, um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e o sistema antioxidante gera um fator denominado estresse oxidativo que acaba por gerar uma oxidação de biomoléculas com um resultado negativo frente às funções fisiológicas ou homeostase celular (Ferreira e Matsubara, 1996; Pereira, 1994). Rock *et al.* (1996) relataram que a geração de EROs é elevada em lesões teciduais gerados por trauma, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, que é ocasionado pelo conjunto de indicadores: aumento das enzimas envolvidas na produção de espécies reativas, ativação do processo de fagocitose, a interrupção na cadeia transportadora de elétrons ou também a liberação dos íons ferro e cobre. A formação de ânion radical superóxido foi seguida primeiramente pela alteração de

estruturas do citoesqueleto e após por liberação de lactato desidrogenase. Adicionalmente, TEMPOL, um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD) e o quelante de ferro desferroxamina protegeram células hepáticas de dano oxidativo induzido por MIC-LR (Ding *et al.*, 2001). Têm sido observado em ratos que os antioxidantes vitamina E (Gehringer *et al.*, 2003a), silimarina (Hermansky *et al.*, 1991) e selênio (Gehringer *et al.*, 2003b) podem prevenir o dano oxidativo causado pela MIC-LR.

Figura 3. Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. (Fonte: Ferreira e Matsubara, 1997).



Mesmo que já seja conhecida a alta hepatotoxicidade da MIC-LR, a verificação e pesquisa sobre o papel deletério desta toxina em nível de sistema nervoso é recente. De acordo Bronger *et al.* (2005), um dos conhecidos transportadores de MIC-LR, o OATP1A2, foi detectado na barreira hematoencefálica (BHE) humana sugerindo assim que esta MIC pode cruzar a BHE. Em mamíferos, perda de memória foi observada em ratos após infusão intrahipocampal de MC-LR (Maidana *et al.*, 2006). Adicionalmente, já foi visualizada a redução de tamanho do encéfalo de filhotes de camundongos expostos a MIC, indicando uma provável neurotoxicidade destas cianotoxinas (Falconer *et al.*, 1988). Assim que

foram verificados os sintomas iniciais de intoxicação no acidente de Caruaru, dos 131 pacientes contaminados na clínica de hemodiálise, 116 apresentaram sintomas imediatos de neurotoxicidade, referindo sintomatologias como surdez, zunido nos ouvidos, cegueira intermitente sendo seguidos dos sinais de hepatotoxicidade (Carmichael *et al.*, 2001).

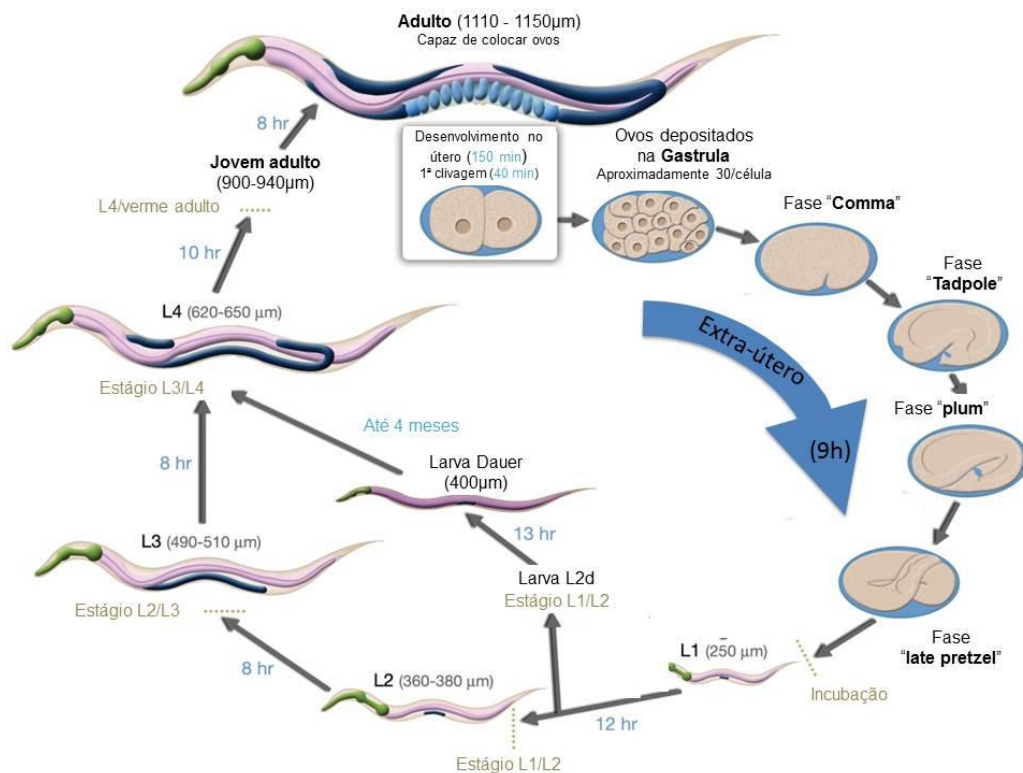
Contudo, apesar da clareza sobre a neurotoxicidade da MIC-LR, os seus mecanismos de intoxicação continuam desconhecidos. Rudrabhatla *et al.* (2009) mostraram que 15 μ M de MIC-LR gerava uma inibição na atividade da PP2A de neurônios do córtex primário de ratos, aumentando a fosforilação de neurofilamentos. Corroborando, Feurstein *et al.* (2010), visualizaram um transporte de MIC através das membranas neuronais por transportadores celulares do tipo OATP com uma subsequente inibição da proteína fosfatase. Sabe-se que há uma correlação direta entre a produção de EROs pela MIC-LR e a hiperfosforilação da proteína Tau em células neuroendócrinas (P12) (Meng *et al.*, 2013). Quando há a fosforilação destas proteínas ocorre uma indução a eventos que geram uma massiva contribuição para a degeneração neuronal (Ballatore *et al.*, 2007). Desta forma, apesar da capacidade da hepatotoxina MIC-LR induzir neurotoxicidade se tornar evidente, o envolvimento do estresse oxidativo neste evento ainda permanece incerto.

1.3. *C. elegans* como modelo alternativo para uso de animais de experimentação

O nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) tem sido apontado como modelo alternativo e de grande relevância para avaliar substâncias benéficas ou tóxicas ao organismo (Gami e Wolkow, 2006; Kaletta e Hengartner, 2006). Isso é possível devido à sua homologia de 60-80% com genes humanos (Kaletta e Hengartner, 2006). Uma vez que atualmente busca-se uma redução na utilização de animais de experimentação, o *C. elegans* aparece como alternativa para estudos *in vivo*, visto que este nematoide permite que os mecanismos de resposta ao estresse sejam facilmente investigados *in vivo* (Kaletta e Hengartner, 2006).

O *C. elegans* possui características que facilitam sua aplicabilidade como a sua fácil manipulação, transparência, curto ciclo de vida (Figura 4) e ainda sua facilidade de cultivo e tempo de geração rápido. Possui ainda uma pequena dimensão (aproximadamente 1mm), fazendo com que possa ser utilizado um pequeno espaço para um grande número (1 placa petri NGM = 1000 vermes). Nayak. *et al.* (2004) relatam a alta taxa de reprodutividade, visto que a população de *C. elegans* é composta por hermafroditas ou machos, e quando há esse cruzamento são gerados aproximadamente 1000 descendentes. Como já citado anteriormente, possui um ciclo de vida curto, facilitando a aplicação de ensaios de cronicidade com um total de 21 dias.

Figura 4. Ciclo de vida do nematóide *C. elegans* com detalhamento de estágios larvais. (Adaptado de Altun, ZF and Hall, DH. 2005)



Estudos recentes relatam o uso do *C. elegans* na elucidação de mecanismos de ação tóxica da MIC-LR (Maxwell *et al.*, 2008). Dengg *et al.* (2004) verificaram a rápida responsividade de *C. elegans* para efeitos tóxicos agudos. Nass e Hamza (2007), implementaram e desvendaram alguns mecanismos e protocolos para a

verificação de toxicidade em *C. elegans*. Após extenso estudo e elucidação do sistema nervoso dos *C. elegans*, este pode ser utilizado como um modelo para investigação de neurotoxicologia (Ávila *et al.*, 2012). Helmcke *et al.* (2010), indicaram que o sistema dopaminérgico dos *C.elegans* é de fácil visualização, contendo apenas 302 neurônios, sendo apenas 8 dopaminérgicos. Nestes neurônios dopaminérgicos é que se possibilita a visualização de danos associados à exposição de algum metabólito ou composto químico.

1.4. Antioxidantes na terapêutica de intoxicações por MIC

Sendo a geração de radicais livres e/ou depleção de antioxidantes endógenos vislumbrados como um potencial mecanismo de toxicidade da MIC-LR e a presença de relatos positivos de utilização de antioxidantes em modelos de hepatotoxicidade (Gehring *et al.*, 2003a; Hermansky *et al.*, 1991; Gehring *et al.*, 2003^b), manipulações da dieta com substâncias antioxidantes poderiam influenciar os quadros de intoxicações por MIC.

Quando comentado sobre o sistema antioxidante exógeno, a maior fonte destes compostos antioxidantes provém da alimentação. São denominados compostos antioxidantes: ácidos fenólicos, antocianinas, carotenoides, flavonoides e polifenóis (Food Ingredients Brasil, 2009). De acordo com Schalch (2004), os carotenoides se destacam em decorrência das suas múltiplas funções pois contam com diferentes propriedades funcionais e também conferem coloração aos alimentos que pode variar de amarelo até o vermelho. Estes possuem a capacidade e funcionalidade de estabilização de moléculas eletronicamente excitadas, realizando de duas formas: química ou fisicamente. Quando há a estabilização química o carotenoide se une a uma molécula excitada e na física, a molécula excitada realiza uma transferência de energia para o carotenoide, que libera a energia em forma de calor para o meio ambiente (Yahia *et al.*, 2010). Os carotenoides podem ser classificados em carotenos e xantofilas (Havaux, 2003).

Dentre os carotenoides com maior destaque e importância para a saúde, destaca-se a luteína (LUT), uma xantofila que têm sido associadas à saúde ocular e acuidade visual (Roberts *et al.*, 2009). A LUT quando ligada à membrana apresenta

a capacidade de remover EROs devido às numerosas ligações duplas conjugadas como pode ser visualizado na Figura 5 (Woodall *et al.*, 1997). A mesma quando oriunda da dieta parece ser incorporada no interior das mitocôndrias, sendo a localização mais favorável para a sua ação contra efeitos mediados por EROs (Chew and Park, 2004). Na natureza é encontrada principalmente em vegetais verde escuro folhosos, porém a mais importante fonte de ésteres de LUT são as espécies de flores conhecidas como *Tagetes* (Figura 6), nas quais a LUT encontra-se quimicamente ligada a alguns tipos de ácidos graxos, tais como o ácido láurico, mirístico e palmítico (Battacharyya *et al.*,2010).

Figura 5. Estrutura química de LUT. (Fonte: Adaptado de Silva, MLC *et al.*,2010).

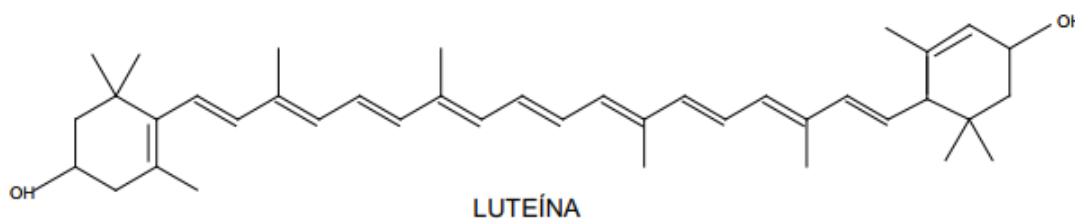


Figura 6. Flor do gênero *Tagetes*, comumente conhecida como cravo-de-defunto. (Fonte: Chengaiah *et al.*, 2010).



Kim *et al.* (2008) relataram o efeito anti-inflamatório da LUT associado à ação de remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion radical superóxido (SOD) *in vitro*. A adição de LUT em cultura de células fotorreceptoras de ratos foi capaz de inibir a apoptose induzida por estresse oxidativo através do contato com paraquat e peróxido de hidrogênio (Chucair *et al.*, 2007). Este carotenoide protegeu ratos de

úlceras gástricas geradas por etanol tendo como mecanismo protetivo a restauração das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), SOD e CAT bem como dos níveis de GSH (Sindhu e Kuttan, 2012). Em outro estudo, a LUT foi capaz de prevenir danos teciduais e oxidativos causados por etanol, tetracloreto de carbono e paracetamol em fígado de ratos (Sindhu *et al.*, 2010). Apesar dos estudos existentes sobre o potencial da LUT em diversos modelos de dano oxidativo, nenhum estudo foi realizado avaliando o potencial protetor deste carotenoide contra danos oxidativos causados por cianotoxinas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na neurotoxicidade causada por MIC-LR em *C. elegans* e o possível efeito protetor do carotenoide LUT contra os danos oxidativos induzidos pela MIC-LR.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vivo* a geração de EROs em cepas de *C.elegans* expostos a diferentes concentrações de MIC-LR;
- Quantificar a expressão das enzimas SOD e CAT em *C. elegans* expostos a diferentes concentrações de MIC-LR;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de MIC-LR sobre a sobrevivência e desenvolvimento de *C. elegans*;
- Avaliar a segurança de LUT em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito protetor do carotenoide LUT sobre os danos oxidativos causados pela MIC-LR;

3. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte deste trabalho de conclusão de curso foram apresentados sob a forma de um artigo científico disposto na versão publicada pelo periódico *Food and Chemical Toxicology*. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas relacionados ao artigo, encontram-se no próprio artigo.

As referências bibliográficas dispostas na sessão 6 dizem respeito as referências citadas na revisão bibliográfica.

A autora detém os direitos de reprodução do presente artigo científico devido a co-autoria do trabalho.

4. RESULTADOS

ARTIGO:

**Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*:
Protective effect of lutein extracted from marigold flowers.**

DOI: 10.1016/j.fct.2017.08.045.

Periódico: Food and Chemical Toxicology

ISSN: 02786915

Volume: 109

Páginas: 60-67

Ano: 2017

Fator de Impacto: 3.778 (2016)

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir:

- MIC-LR em concentrações ambientalmente relevantes não causaram geração de EROs, morte ou alteração na expressão da enzima catalase;
- A concentração de 500 μL foi capaz de alterar todos os parâmetros de forma significativa;
- LUT nas concentrações de 10 a 250 μM causou redução na taxa de sobrevivência e aumento na geração de EROs.
- A dose de 5 μM não causou toxicidade aos nematoides e apresentou efeitos protetores contra os danos causados pela MIC-LR.

Desta maneira, a LUT aparece como alternativa promissora para utilização na terapêutica de intoxicações por MIC-LR. Ainda, a enzima SOD pode ser um marcador útil em intoxicações, uma vez que sofreu alterações antes que os demais marcadores.

REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. **Method Enzymol**, 105: 121-126, 1984.
- AVILA D, HELMCKE K, ASCHNER M. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. **Hum Exp Toxicol**, 31:236-243, 2012.
- ALTUN ZF, HALL DH. Handbook of *C. elegans* Anatomy. In **WormAtlas**, 2005. <<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/contents.htm>>
- ARUOMA OI. Free radicals and antioxidant strategies in sports. **J Nutr Biochem**, 5: 370-381, 1994.
- BALLATORE C, LEE VM, TROJANOWSKI JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. **Nat Rev Neurosci**, 8: 663-672, 2007.
- BARCELOS GR, GROTO D, SERPELONI JM, AISSA AF, ANTUNES LM, KNASMÜLLER S, BARBOSA F JR. Bixin and norbixin protect against DNA-damage and alterations of redox status induced by methylmercury exposure in vivo. **Environ Mol Mutagen**, 53: 535-541, 2012.
- CHENGAI AH B, MALLIKARJUNA KR, MAHESH MK, ALAGUSUNDARAM M, MADHUSUDHANA CC. MEDICINAL IMPORTANCE OF NATURAL DYES A REVIEW. **Int J Pharm Tech Res**, 2: 144-154, 2010.
- HATTACHARYYA, S.; DATTA, S.; MALLICK, B.; DHAR, P.; GHOSH, S. Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. **J Agricult Food Chem**, 58: 8259–8264, 2010.
- BRANDÃO LH, DOMINGOS P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. **Saúde & Amb em Rev**, 1:40-50, 2006.
- BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Ministério da Saúde**, 32p, 2004.
- BRONGER H, KÖNIG J, KOPFLOW K, STEINER HH, AHMADI R, HEROLD-MENDE C, KEPLER D, NIES AT. BCC drug efflux pumps and organic anion uptake

transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. **Cancer Res**, 65:11419-11428, 2005.

CARBIS CR, RAWLIN GT, GRANT P, MITCHELL GF, ANDERSON JW, MCCAULEY I. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. **J Fish Dis**, 20:81-91, 1997.

CARMICHAEL WW. Cyanobacteria secondary metabolites—The cyanotoxins. **J Appl Bacteriol**, 72: 445-459, 1992.

CARMICHAEL WW, AZEVEDO SM, AN JS, MOLICA RJ, JOCHIMSEN EM, LAU S, RINEHART KL, SHAW GR, EAGLESHAM GK. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ Health Perspect**, 109: 663-668, 2001.

CHEW BP, PARK JS. Carotenoid action on the immune response. **J Nutr**, 134: 257S-261S, 2004.

CHUCAIR AJ, ROTSTEIN NP, SANGIOVANNI JP, DURING A, CHEW EY, POLITI LE. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 48: 5168-5177, 2007.

CRAIG HL, WIRTZ J, BAMPS S, DOLPHIN CT, HOPE IA. The significance of alternative transcripts for *Caenorhabditis elegans* transcription factor genes, based on expression pattern analysis. **BMC Genomics**, 14:1-20, 2013.

DENGG M, JACQUES CA, MEEL V. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 50:209-204, 2004.

DIMASCIO P, DAVASAGAYAN T, KAISER S, SIESS H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem Soc Trans**, 18: 1054-1056, 1990.

DING WX, SHEN HM, ZHU HG, OHNG CN. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. **Environ Res**, 78:12-18, 1998.

DING WX, SHEN HM, ONG CN. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. **J Toxicol Environ Health**, 23:507- 519, 2001.

DROBAC D, TOKODI N, SIMEUNOVIĆ J, BALTIC V, STANIĆ D, SVIRČEV Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. **Arh Hig Rada Toksikol**,64:305-316, 2013.

ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**. 82: 70-77, 1959.

FALCONER IR, SMITH JV, JACKSON AR, JONES A, RUNNEGAR MT. Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year. **J Toxicol Environ Health**, 24; 291-305, 1988.

FEURSTEIN D, KLEINTEICH J, HEUSSNER AH, STEMMER K, DIETRICH DR. Investigation of Microcystin Congener-Dependent Uptake into Primary Murine Neurons. **Environ Health Perspect**, 118: 1370-1375, 2010.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43: 61-68, 1997.

GAMI MS, WOLKOW CA. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. **Aging Cell**, 5:31-37, 2006.

GEHRINGER MM, GOVENDER S, SHAH M, DOWNING TG. Investigation of the role of Vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. **Environ Toxicol**, 18: 142-148, 2003a.

GEHRINGER MM, DOWNS KS, DOWNING TG, NAUDE RN, SHEPARD EG. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystin hepatotoxicity. **Toxicol**, 41: 1-8, 2003b.

GELAIN DP, DE SOUZA LF, RIBEIRO GR, ZIM M, JARDIM FR, MOREIRA JC, BERNARD EA. Extracellular inosine is modulated by H₂O₂ and protects sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. **Free Radic Res**, 38: 37-47, 2004.

- GELAIN DP, MOREIRA JCF. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. **Toxicol in Vitro**. 22: 553-558, 2008.
- GIATTI LL, NEVES NLS, SARAIVA GNM, TOLEDO RF. Exposição à água contaminada: percepções e práticas em um bairro de Manaus, Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, 28:337–343, 2008.
- HABIG W, JAKOBY WB. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Method Enzymol**, 77: 398-405, 1981.
- HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends Plant Sci**, 3: 147-151, 2003.
- HELMCKE KJ, AVILA DS, ASCHNER M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research. **Neurotoxicol Teratol**, 32:62-67, 2010.
- HERMANSKY SJ, STOHS SJ, ELDEEN ZM, ROCHE VF, MEREISH KA. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. **J Appl Toxicol.**, 11:65-73, 1991.
- HONG-RONG X, LIN-SEN H, GUO-YI L. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **China Med J**, 123: 1086-1092, 2010.
- IBGE. Pesquisa nacional de saneamento básico : 2008. **IBGE, Coordenação De População e Indicadores Sociais**. 218p, 2010.
- JU J, RUAN Q, LI X, LIU R, LI Y, PU Y, YIN L, WANG D. Neurotoxicological evaluation of microcystin-LR exposure at environmental relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environ Sci Pollut Res**, 20:1823-1830, 2013.
- KALETTA T, HENGARTNER M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, 5:387-398, 2006.
- KIM JH, NA HJ, KIM CK, KIM JY, HA KS, LEE H, CHUNG HT, KWON HJ, KWON YG, KIM YM. The non-provitarnin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappa B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappa B-inducing kinase pathways: role of H₂O₂ in NF-kappa B activation. **Free Radical Biol Med**, 45: 885-896, 2008.

KONDO F, MATSUMOTO H, YAMADA S, ISHIKAWA N, ITO E, NAGATA S, UENO Y, SUZUKI M, HARADA K. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. **Chem Res Toxicol**, 9: 1355-1359, 1996.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, AHN BW, SHALTIEL S, STADTMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Method Enzymol**, 186: 464-478, 1990.

LIMA ME. *Caenorhabditis elegans*: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica. **Universidade Federal do Pampa**, 2013.

LIN ZX, HOULT JRS, RAMAN A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **J Ethnopharmacology**, 66: 141-150, 1999.

MAIDANA M, CARLIS V, GALHARDI FG, YUNES JS, GERACITANO LA, MONSERRAT JM, BARROS DM. Effects of microcystins over short-and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. **Chemico-Biol Interactios**, 159: 223-234, 2006.

MAXWELL CKL, PHILLIP LW, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, Meye JN. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicol Sci**, 106: 5–28, 2008.

MENG G, LIU J, LIN S, GUO Z, XU L. Microcystin-LR-Caused ROS generation involved in p38 activation and tau hyperphosphorylation in neuroendocrine (PC12) cells. **Environ Toxicol**, *In Press*, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. 56p, 2003.

MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide-dismutase. **J Biol Chem**, 247: 3170-3175, 1972.

MOLICA R, Azevedo S. ECOFISIOLOGIA DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CIANOTOXINAS. **Oecol Bras**,13: 229-246, 2009

NASS R, HAMZA I. The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters. **Curr Protoc Toxicol**, 1: 1.9-1.8, 2007.

NAYAK S, Goree J, Schedl T. "Fog-2 and the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis*". **PLoS Biology** 3: e6, 2004.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipide peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**. 95: 351-358, 1979.

PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Rev Paul Ed Fís**, 8:77-89, 1994.

PEUTHERT A, WIEGAND C. Glutathione involvement in the biotransformation of microcystins in *Dreissena polymorpha*. **Poster abstract, 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC)** 21-27. June, Bergen, Norway, 2004.

PONTES CAA, SCHRAMM FR. Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável. **Cad Saúde Pública**, 20:1319-1327, 2004.

PRIETO AI, JOS A, PICHARDO S, MORENO I, DE SOTOMAYOR MA, MOYANO R, BLANCO A, CAMEAN AM. Time-dependent protective efficacy of Trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ Toxicol**, 24: 563-579, 2009.

RABELO TK, ZEIDÁN-CHULIÁ F, VASQUES LM, DOS SANTOS JPA, DA ROCHA RF, PASQUALI MAB, RYBARCZYK-FILHO JL, ARAÚJO AAS, MOREIRA JCF, GELAIN DP. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicol in Vitro**, 26: 304-314, 2012.

ROBERTS RL, GREEN J, LEWIS B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clin Dermatol**, 27: 195-201, 2009.

SILVA MLC, COSTA RS, SANTANA AS, KOBLITZ MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, 31: 669-682, 2010.

SINDHU ER, FIRDOUS AP, PREETHI KC, KUTTAN R. Carotenoid lutein protects rats from paracetamol-, carbon tetrachloride- and ethanol-induced hepatic damage. **J Pharm Pharmacol**, 62: 1054-1060, 2010.

ROCK CL, JACOB RA, BOWEN PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J Am Diet Assoc**, 96: 693-702, 1996.

SINDHU ER, PREETHI KC, KUTTAN R. Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. **Indian J Exp Biol**, 48: 843-848, 2010.

SINDHU ER, KUTTAN R. Carotenoid lutein protects rats from gastric ulcer induced by ethanol. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, 23: 33-37, 2012.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA, D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, 82: 1107-1112, 1990.

SOARES, S. R. A.; BERNARDES, R. S. & CORDEIRO NETTO, O. M. Relações entre saneamento, saúde pública e meio ambiente: elementos para formulação de um modelo de planejamento em saneamento. **Cad Saúde Pública**, 18:1713-1724, 2002.

Tundisi, J. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados** 22, 2008.

VAN APELDOORN ME, VAN EGMONG HP, SPEIJERS GJ, BAKKER GJ. Toxins of cyanobacteria. **Mol Nutr Food Res**, 51: 7-60, 2007.

WIEGAND C, PFLUGMACHER S, Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicol Appl Pharmacol**, 203: 201-218, 2005.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Progress and sanitation and drinking-water: update 2011

WOODALL AA., LEE SWM., WEESIE RJ, JACKSON MJ, BRITTON G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochim Biophys Acta**, 1336: 33-42, 1997.

YAZAKI K, YOSHIKOSHI C, OSHIRO S, YANASE S. Supplemental cellular protection by a carotenoid extends lifespan via Ins/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Oxid Med Cell Longev**, 596240: 1-9, 2011.

ANEXO I – NORMAS DA REVISTA DE PUBLICAÇÃO

Normas da revista de publicação

Revista: Food and Chemical Toxicology

Formato	PDF ou Word, mas no momento de revisão é obrigatório o envio em Word.
Estrutura do artigo	<p>Título</p> <p>Resumo/Abstract</p> <p>Palavras-chave</p> <p>Introdução</p> <p>Métodos</p> <p>Resultados</p> <p>Discussões</p> <p>Conclusões</p> <p>Reconhecimentos/Agradecimentos</p> <p>Referências</p> <p>Dados suplementares</p>
Check-list de submissão	<p>Um autor foi designado como o autor correspondente com detalhes de contato:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Endereço de e-mail • Endereço postal completo <p>Todos os arquivos necessários foram carregados:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Manuscrito: <ul style="list-style-type: none"> • Inclua palavras-chave • Todos os números (incluem legendas relevantes) • Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé) • Assegure-se de que todas as citações de figuras e tabelas no texto correspondam aos arquivos fornecidos • Indicar claramente se a cor deve ser usada para qualquer figura na impressão <p>Arquivos Gráficos de Resumos / Destaques (quando aplicável)</p> <p>documentos suplementares (quando aplicável)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Considerações adicionais:

	<ul style="list-style-type: none"> • O manuscrito foi submetido a "verificação ortográfica" e "verificação gramatical"; • Todas as referências mencionadas na Lista de Referências são citadas no texto, e vice-versa • Foi obtida permissão para uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet) • Uma declaração de interesses concorrentes é fornecida, mesmo que os autores não tenham interesses concorrentes para declarar • As políticas do jornal detalhadas neste guia foram revistas • Sugestões de árbitros e detalhes de contato fornecidos, com base nos requisitos do diário.
Ilustrações	<p>As ilustrações são críticas, por que ...</p> <p>Figuras e tabelas são a maneira mais eficiente de apresentar resultados</p> <p>Os resultados são a força motriz da publicação</p> <p>Legendas e legendas devem ser detalhadas o suficiente para fazer figuras e tabelas auto-explicativas</p> <p>Nenhuma duplicação de resultados descritos em texto ou outro ilustrações</p>
Use linguagem manuscrita adequada	<p>Pergunte a um falante nativo ou use um serviço de edição de idioma para melhorar seu trabalho antes de enviá-lo.</p> <p>O inglês pobre dificulta o editor e os revisores para entender o seu trabalho e pode levar à rejeição do seu papel</p> <p>Esteja atento aos erros comuns:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✘ Construção de sentenças ✘ tempos incorretos ✘ Gramática imprecisa ✘ Mixing languages <p>A linguagem inglesa deve ser usada em todo o manuscrito, incluindo figuras, gráficos, gráficos e fotos.</p>

Você está pronto para enviar?	Seus resultados avançam a compreensão em um campo de pesquisa específico? Seu trabalho é de interesse para a audiência do jornal? Seu manuscrito está estruturado corretamente? Suas conclusões são justificadas pelos seus resultados? Suas referências são acessíveis / internacionais? Você formatou seus números e tabelas corretamente? Você corrigiu todos os erros gramaticais e ortográficos?
-------------------------------	---