



Faculdade de Pindamonhangaba



Raquel de Carvalho Marciano

ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA

**Pindamonhangaba – SP
2017**



Faculdade de Pindamonhangaba



Raquel de Carvalho Marciano

ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba

Orientador: Prof. Dr. Claudemir De Carvalho

**Pindamonhangaba – SP
2017**

Raquel de Carvalho Marciano;

Esteatose hepática em ratos com obesidade induzida / Raquel de Carvalho
Marciano; / Pindamonhangaba-SP : FUNVIC
Faculdade de Pindamonhangaba, 2017.

21F. : il.

Monografia (Graduação em Farmácia) FUNVIC-SP.

Orientador: Prof. Dr. Claudemir de Carvalho.

1 Esteatose Hepática. 2 Doença hepática não alcoólica. 3 Ratos obesos.

I Esteatose Hepática em Ratos com obesidade induzida II Raquel de Carvalho
Marciano.



Faculdade de Pindamonhangaba



RAQUEL DE CARVALHO MARCIANO

ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Diploma de Bacharel pelo Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba

Data: 08/12/17

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudemir de Carvalho

Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura: _____

Prof. Dra. Sandra I. Sprogis dos Santos

Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura: _____

Profa. Dra. Luciana Cristina S. Chaud

Faculdade de Pindamonhangaba

Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Aos meus pais, meu esposo e sogros por
todo apoio, nessa trajetória,
neste momento da minha vida.

A minha filha Maria Clara,
que me incentiva a crescer a cada dia.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, às minhas Entidades e Divindades de Luz, pelas oportunidades para minha construção profissional. Pelo fortalecimento do meu caráter e autoconfiança, perseverança e por ter me concedido boa saúde e disposição para realização deste trabalho.

Agradeço a minha família pelo incentivo, por toda paciência, pela compreensão e carinho, principalmente ao meu esposo Felipe e ao meu sogro Reynaldo. Através de vocês consegui alcançar uns de meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudemir de Carvalho, sou eternamente grata pela confiança dispensada desde o meu ingresso nessa instituição de ensino. Por compartilhar conhecimentos, acompanhar o desenvolvimento do meu trabalho e pela disposição de ajudar e aconselhar me, e por ter muita paciência.

Ao professor Guilherme Urias pela elaboração da análise estatística dos resultados.

A FUNVIC - Faculdade de Pindamonhangaba, por toda sua estrutura disciplinar.

Aos funcionários do Biotério da instituição.

As minhas colegas de estudo, que me ajudaram desde o início do experimento, Aline e Brenda.

Aos professores, em especial ao Prof Ms. Lincoln M. L. Cardoso e a Profa Dra Luciana C. S. Chaud do curso de Farmácia da instituição, por todas as formas de ensinamento, amizade e colaboração.

Aos demais funcionários da instituição pelos diversos serviços prestados com atenção e competência. E ao Sr Adão da limpeza, que toda manhã me desejava “boa aula, vai dar tudo certo”.

Este trabalho de Conclusão de Curso foi redigido na forma de artigo científico a ser submetido à **Revista Ciência e Saúde On-line**, cujas normas estão em anexo.

ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA

HEPATIC STEATOSIS IN RATS WITH INDUCED OBESITY

Raquel de Carvalho Marciano¹, Guilherme Muniz Pereira Chaves Urias², Claudemir de Carvalho³

¹Graduanda do Curso de Farmácia, FUNVIC / Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba-SP

²Doutor em Educação para a Ciência

³Professor Doutor, Curso de Farmácia, FUNVIC / Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba-SP

Resumo

A esteatose hepática é uma doença metabólica resultante da alteração da síntese de triglicérides a partir de ácidos graxos. Caracteriza-se pelo acúmulo de micro e macro vesículas de lipídeos no citoplasma das células hepáticas, numa graduação que varia de insignificante a severa. Neste experimento foi induzida a obesidade em 15 ratos Wistar por meio da ingestão de uma dieta hipercalórica, durante nove semanas. Esses animais foram mantidos no biotério da instituição, em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlados. O grupo controle (n=10) foi mantido em mesmas condições, porém com ingestão de ração normocalórica. O consumo de ração, água e o peso dos animais foram mensurados durante o experimento. Após esse período os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e foi coletada amostra do fígado de todos os animais para histopatologia. No grupo tratado observou-se esteatose discreta (40%) e moderada (60%), enquanto no grupo controle observou-se esteatose insignificante em um dos animais apenas. Houve, portanto significância estatística ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: Esteatose hepática. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Ratos obesos

Abstrat

Hepatic steatosis is a metabolic disease resulting from the alteration of the synthesis of triglycerides from fatty acids. It is characterized by the accumulation of micro and macro vesicles of lipids in the cytoplasm of hepatic cells, ranging from insignificant to severe. In this experiment obesity was induced in 15 Wistar rats by eating a hypercaloric diet for nine weeks. These animals were kept in the vivarium of the institution, in an environment with controlled temperature and light cycle. The control group (n = 10) was maintained under the same conditions, but with normocaloric ration intake. Feed intake, water and animal weight were measured during the experiment. After this period the animals were sacrificed by anesthetic deepening and a liver sample of all the animals was collected for histopathology. In the treated group, mild (40%) and moderate (60%) steatosis was observed, while in the control group insignificant steatosis was observed in one animal only. There was, therefore, statistical significance ($p < 0.0001$).

Keywords: Hepatic steatosis. Fatty non-alcoholic liver disease. Obese rats.

Introdução

A esteatose hepática (EH) consiste no acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, que atinge 5% a 40% do peso do órgão. É a alteração metabólica hepática mais frequente e resulta no desequilíbrio entre a síntese de triacilgliceróis (TAG) a partir de ácidos graxos, e a baixa secreção destes pelo hepatócito na forma de lipoproteínas. Inicialmente, os TAG acumulam-se nos hepatócitos por uma ou mais das seguintes vias: aumento da quantidade de ácidos graxos livres circulantes; redução da β -oxidação, ou diminuição da síntese ou da secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que é a principal responsável pela secreção de TAG pelo fígado.¹

As alterações morfológicas hepáticas relacionadas à EH podem ser de origem alcoólica (ou ter etiologias diversas. A partir da década de 1980, as alterações de etiologias não alcoólicas passaram a ser denominadas Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Apesar de ter sido apontada há muito tempo como condição benigna, 15% a 40% dos casos de EH pode progredir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) apresentando inflamação, balonização e fibrose perissinusoidal e/ou portal, e formas mais graves e terminais de doenças hepáticas, tais como cirrose (20% dos casos) e carcinoma hepatocelular.²

A real prevalência da EH é ainda desconhecida, mas sabe-se que ela atinge adultos e crianças e está emergindo como a condição hepática mais comum no mundo ocidental.³ Estima-se que 20% a 30% dos adultos e até 75% dos pacientes com diabetes mellitos e obesidade, em países ocidentais, possam ter EH.^{4,5} Estudos recentes descobriram que a DHGNA também está associado a disfunção pancreática significativa de células β em indivíduos obesos não-diabéticos.^{6,7}

Sob o ponto de vista nutricional, a EH desperta grande interesse por sua forte correlação com a obesidade, as dislipidemias e o diabetes mellitos tipo 2, cujo principal elemento é a resistência à insulina.^{8,9}

A obesidade pode ser encarada como um grave dilema de saúde pública no Brasil e em muitos países do mundo e está associada com doenças cardiovasculares, metabólicas e neurais, como hipertensão arterial, trombose e acidente vascular cerebral. A obesidade decorre de várias condições genéticas e ambientais, incluindo hábitos alimentares incorretos e ausência de atividade física.⁸

Ligada a várias condições de riscos metabólicos, tais como resistência à insulina, níveis plasmáticos elevados de Triglicérides (TG) e baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), a obesidade está vinculada a uma redução da esperança de vida em países desenvolvidos e em crescimento.^{1,8}

Dada a crescente importância da DHGNA e tendo em vista os hábitos alimentares da população ocidental com base em uma dieta rica em carboidratos de absorção rápida, especialmente os hábitos do paciente obeso, o objetivo do presente estudo foi oferecer dieta hipercalórica, com alto teor de carboidratos, para um grupo de ratos e investigar a presença de esteatose hepática nos ratos obesos.

Método

Foram utilizados 25 Ratos Wistar (grupos de 5 animais) com seis meses de vida e peso médio de 340 g. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁽⁵⁾, com ciclo de 12 horas de escuro. O modelo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FUNVIC / Faculdade de Pindamonhangaba, protocolo 023/2012.

Os animais foram separados em grupo controle (GC, n=10), que recebeu alimentação normocalórica composta por ração comercial para ratos (Nuvilab® CR1), e grupo experimental (GE,

n=15), alimentado com dieta hipercalórica constituída por 450 g de ração Nuvilab CR1, 150 g de bolacha de amido de milho, 300 g de amendoim com casca e 300 g de chocolate ao leite hidrogenado.¹⁰

A alimentação e a água foram fornecidas à vontade diariamente, durante nove semanas. A ingestão de alimentos e de água foi mensurada diariamente, no início da manhã, subtraindo a sobra do volume oferecido na manhã anterior. O peso corporal foi monitorado semanalmente, durante o período experimental. Todos os animais tiveram massa corporal registrada no final do experimento por meio de balança semi analítica (Marte Balance®). Foram considerados obesos os animais do grupo GE que apresentaram ganho de peso 15% superior ao do grupo controle, o que ocorreu na terceira semana.¹¹ Os dados foram tabulados e expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados utilizando o teste t de Student com nível crítico fixado em 5% ($p < 0,05$).

Eutanásia, necropsia e coleta de amostras

Após o tratamento os animais foram submetidos à eutanásia por processo indolor (0,2 mL/100 g de peso vivo de uma solução 1:1 de cloridrato de xilasina 2% e cloridrato de quetamina 10%) para coleta do órgão alvo. O óbito foi induzido por aprofundamento anestésico. A necropsia foi realizada por incisão na linha branca e abertura de abdômen e do tórax.

Histologia

Após inspeção macroscópica, fragmentos do fígado de cada animal foram coletados e fixados em solução de formaldeído a 10% tamponada, para preparo de cortes histológicos conforme rotina histotécnica. Para microscopia foram realizados cortes histopatológicos de 5 μ m que foram fixados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) de maneira convencional. Os cortes foram analisados em microscópio óptico binocular. Investigou-se a presença de micro e macro vesículas de lipídios nos hepatócitos.

A classificação quanto ao teor de lipídeos hepáticos foi expressa em cruces (0 a 3+), obtida pela predominância referente a seis campos microscópicos aleatórios de cada animal dos grupos GE e GC (Almeida et al.¹² modificado), considerando-se: 0+: ausência ou presença insignificante de gotas lipídicas no citoplasma hepático; 1+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade leve (menos de 25% do campo analisado); 2+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade moderada (25 a 50% do campo analisado); 3+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade alta (mais de 50% do campo analisado).¹² Para análise dos dados foi utilizado o teste de Mann-Whitney para grupos independentes, com nível de significância de 5%.

Resultados

A ingestão diária de água e de ração foi semelhante entre animais do mesmo grupo, porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados animais tratados com animais controles, sendo

maior a ingestão pelos animais tratados com a ração hipercalórica (Tabela 1). Da mesma forma, houve significância estatística ($p < 0,05$) quando se comparou peso inicial e peso final dos animais do grupo experimental e quando se comparou GE com GC (Tabela 1).

Tabela 1- Média e desvio padrão do consumo de ração (g) e água (mL) e do Peso (g) de ratos Wistar tratados com ração hipercalórica (GE) e seus controles

	C	E
Consumo de ração	125,65± 8,04	200,36± 22,33*
Consumo de água	109,48± 15,56	146,29± 12,52*
Peso	417,77± 9,35	496,70± 40,27*

* $P < 0,05$ quando se comparou E com C

Não foram observadas alterações macroscópicas no fígado de nenhum dos animais.

Quanto à microscopia hepática, foi observada esteatose insignificante em um animal do grupo-controle (10%) (predominância de hepatócitos com núcleo de aparência e localização normais), contra 40% de esteatose discreta e 60% moderada no grupo experimental (hepatócitos com tamanho aumentado pela presença de gotículas de gordura no citoplasma), mostrando que houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos GE e GC quanto à presença de esteatose hepática (Figura 1). Não foi observada esteatose acentuada ou intensa em nenhum animal obeso. Foram observados indícios da formação de ateromas na parede de vasos sanguíneos (Figura 1B) de quatro animais do grupo experimental (26,66%). Foi observado também infiltrado inflamatório em pequena intensidade, em cinco (33,33%) animais do grupo experimental (dados não mostrados).

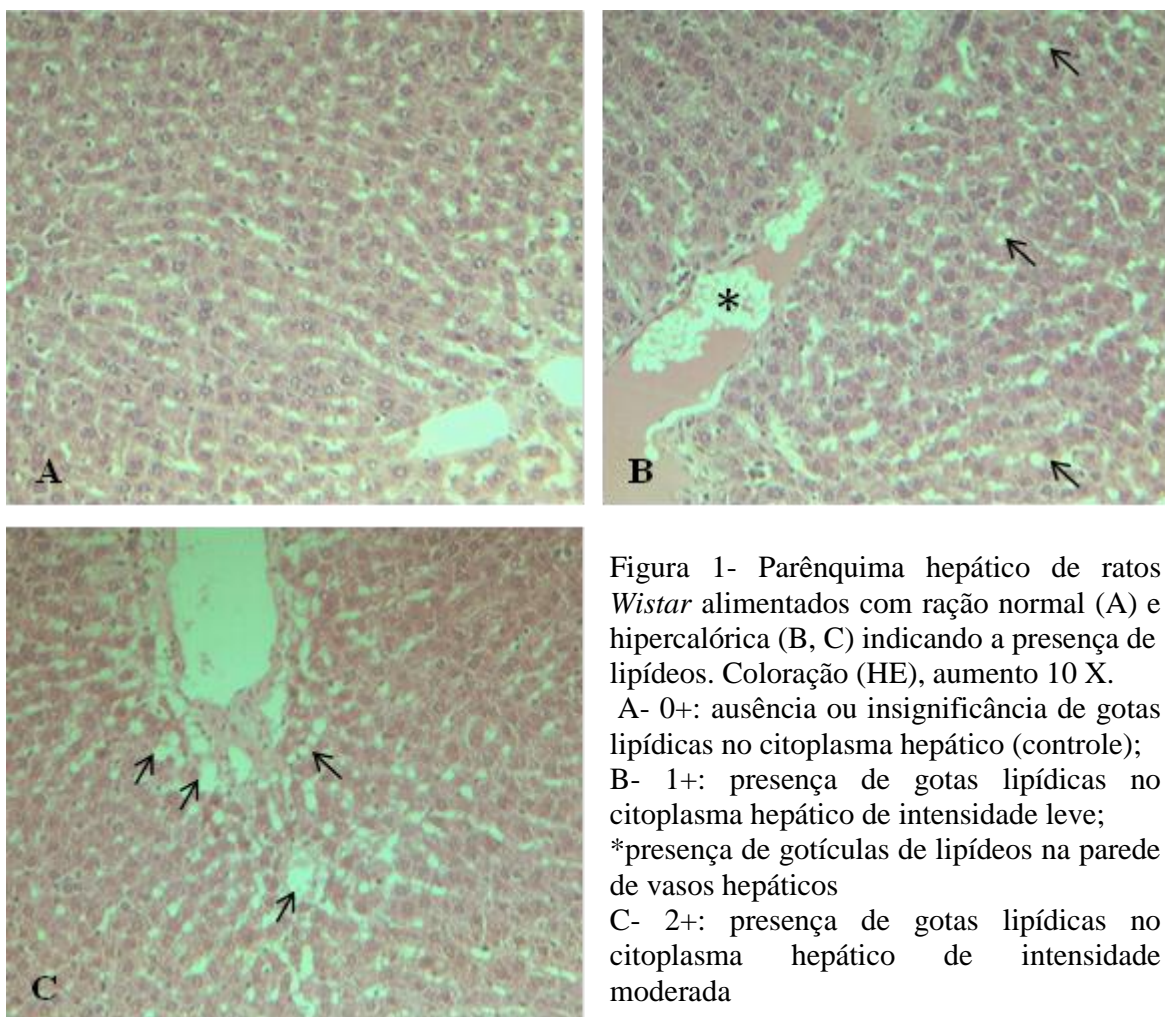


Figura 1- Parênquima hepático de ratos *Wistar* alimentados com ração normal (A) e hipercalórica (B, C) indicando a presença de lipídeos. Coloração (HE), aumento 10 X.

A- 0+: ausência ou insignificância de gotas lipídicas no citoplasma hepático (controle);

B- 1+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade leve;

*presença de gotículas de lipídeos na parede de vasos hepáticos

C- 2+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade moderada

Discussão

Estudos em animais ajudam a entender os mecanismos fisiopatogênicos e terapêuticos de DHGNA. Vários modelos de animais estão atualmente disponíveis para o estudo desta condição e de EH, embora nenhum deles possa reproduzir completamente os componentes essenciais da doença no ser humano.¹³⁻¹⁵

A esteatose hepática emerge como a condição hepática mais comum no mundo ocidental, atingindo crianças e adultos portadores de DHGNA.³ No entanto, nos últimos 20 anos, também nos países asiáticos a prevalência de DHGNA cresceu rapidamente e demonstrou ser uma tendência para gerações mais jovens, provavelmente em função da mudança de hábitos alimentares, com a introdução das *fast foods*.¹⁶

A gordura se acumula nos hepatócitos quando a quantidade de ácidos graxos que entra no fígado (ácidos graxos não esterificados absorvidos pelo plasma e ácidos graxos sintetizados de novo nos hepatócitos) é maior que a quantidade de ácidos gordurosos que sai (oxidação de ácidos graxos e secreção de ácido graxo ligada a triglicerídeos).¹⁷ No presente estudo, a dieta hipercalórica administrada por nove

semanas induziu EH, conforme revelado pelos vacúolos lipídicos detectados por análise histológica em todos os animais tratados. Achados similares são descritos por outros pesquisadores.¹⁸⁻²⁰ No entanto, o tempo de 9 semanas de ingestão de tratamento não foi suficiente para o desenvolvimento de esteatose hepática intensa (3+).

A esteatose hepática é caracterizada por um acúmulo de partículas de lipídeos, fazendo com que o fígado apresente um peso 5% maior que o valor de referência, sendo essa característica uma resultante direta do tipo de fonte lipídica utilizada.²¹ Neste estudo, não se observou alteração da macroscopia do órgão com aparente manutenção da sua massa, embora não se tenha procedido à pesagem do fígado dos animais.

Almeida et al.¹² descreveu presença de gotículas lipídicas na parede das coronárias e vasos hepáticos de animais com obesidade induzida por diferentes métodos, o que também foi observado no fígado dos animais deste experimento. Isso demonstra a necessidade de outros estudos para verificar se foram oriundas da própria síntese vascular e se conduzirão a processos patológicos.

Outro achado histológico, embora sem significância neste experimento, foram os infiltrados inflamatórios. É de conhecimento que a obesidade é uma doença sistêmica que resulta em um processo inflamatório intenso,^{22,23} sugerindo que, se a ingestão da ração hipercalórica fosse mantida por período de tempo mais longo, esses infiltrados no fígado dos animais experimentais poderiam significar um agravamento da doença com uma provável evolução para uma esteatohepatite.^{2,24}

Conclusão

O modelo adotado mostrou-se eficaz para indução de obesidade em ratos adultos, como também para a indução de esteatose de intensidade leve e intensidade moderada, confirmando a relação entre obesidade e a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. O tempo de consumo da ração hipercalórica não foi suficiente para indução de esteatose severa.

Referências

1. Oda E. The Metabolic Syndrome as a Concept of Adipose Tissue Disease. *Hypertens Res.* 2008;31(7):1283-91.
2. Silva GH, Escanhoela CAF. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. *Rev. Ciênc. Méd.* 2009;18(5/6):269-79.
3. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-31.
4. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(Suppl 1):S5-10.
5. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32345-53.

6. Bedogni G, Gastaldelli A, Tiribelli C, Agosti F, De Col A, Fessehatsion R, et al. Relationship between glucose metabolism and non-alcoholic fatty liver disease severity in morbidly obese women. *J. Endocrinol. Investig.* 2014;37:739-44.
7. Siddiqui MS, Cheang KL, Luketic VA, Boyett S, Idowu MO, Patidar K, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (nash) is associated with a decline in pancreatic beta cell (β -cell) function. *Dig. Dis. Sci.* 2015, doi:10.1007/s10620-015-3627-7.
8. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004; 116(2):337-50.
9. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999;29(3):664-9.
10. von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induced obesity in rats. *Acta Cir. Bras.* 2006;21(6):425-9.
11. Levin BE, Triscari E, Sullivan AC. Metabolic features of diet-induced obesity without hyperphagia in young rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1986; 251(3):433-40.
12. Almeida MEF, Medeiros RS, Figueiredo FJB, Coelho EJB, Sena MPT. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídeos e glicemia de ratos wistar. *Alim.Nutr.* 2011;22(3):359-65.
13. Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004;8:559-74.
14. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:502-9.
15. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.* 2006;55:2159-70.
16. Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol.* 2009;50:204-10.
17. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* 2013;19:210-5.
18. Pereira LO, Francischi RP, Lancha AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(2):111-27.
19. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC: A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):968-74.
20. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U: Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced

reproductive toxicity. *Biol Reprod.* 2010;82(1):94-104.

21. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):829-38.
22. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Lipid Res.* 2007;48(9):1905-14.
23. Medzhitov R. Inflammation. New adventures of an old flame. 2010;140(6):771-6.
24. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients.* 2015;7:4995-5019, doi:10.3390/nu7064995.

ANEXO 1 - DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos devem ser redigidos em português, o uso da forma culta correta é de responsabilidade dos autores. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. A Revista Ciência e Saúde on-line sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial que poderá solicitar a adequação. Pesquisas feitas com seres humanos e animais devem, obrigatoriamente, citar a aprovação da pesquisa pelo respectivo Comitê de Ética. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Da mesma forma, o plágio implicará na recusa do trabalho. Os autores dos artigos aceitos poderão solicitar a tradução do artigo para língua inglesa nos tradutores indicados pela revista e reenviar. Os custos com a tradução serão de responsabilidade dos autores. O periódico disponibilizará aos leitores o conteúdo digital em ambos os idiomas, português e inglês.

APRESENTAÇÃO DO MATERIAL

Sugere-se um número máximo de 20 páginas, incluindo referências, figuras, tabelas e quadros. Os textos devem ser digitados em **Fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento 1,5, justificado, exceto Resumo e Abstract**. Devem ser colocadas margens de 2 cm em cada lado.

As Figuras: gráficos, imagens, desenhos e esquemas deverão estar inseridas no texto, apresentar boa qualidade, estar em formato JPEG, com resolução de 300dpi com 15cm x 10cm. O número de figuras deve ser apenas o necessário à compreensão do trabalho. Não serão aceitas imagens digitais artificialmente 'aumentadas' em programas computacionais de edição de imagens. As figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem e suas legendas devem estar logo abaixo.

Tabelas e Quadros: deverão ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçados pelo título. As tabelas e os quadros devem estar inseridos no texto. Não serão admitidas as tabelas e quadros inseridos como Figuras.

Títulos de tabelas e quadro e legendas de figuras deverão ser escritos em tamanho 11 e com espaço simples entre linhas.

Citação no texto: deve-se seguir o sistema numérico de citações, em que as referências são numeradas na ordem em que aparecem no texto e citadas através dos seus números sobrescritos (depois de ponto e de vírgula; antes de ponto e vírgula e dois pontos). Citações de mais de uma referência devem obedecer ordem numérica crescente. Quando no final da frase, os números das referências devem aparecer depois da pontuação. Citações com numerações consecutivas devem ser separadas por hífen (Ex: 3-6); em caso contrário, deve-se utilizar vírgula (Ex: 3,4,9,14). Toda referência deverá ser citada no texto. Exemplos: Conforme definem Villardi et al.1, a perda óssea alveolar... O uso de implante de carga imediata tem sido discutido por vários autores.1,3,5-8 Teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos **últimos três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente, **apresentar o link** que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e aos bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato pdf.

Grafia de termos científicos, comerciais, unidades de medida e palavras estrangeiras: os termos científicos devem ser grafados por extenso, em vez de seus correspondentes simbólicos abreviados. Incluem-se nessa categoria os nomes de compostos e elementos químicos e binômios da nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica. Os nomes genéricos de produtos devem ser preferidos às suas respectivas marcas comerciais, sempre seguidos, entre parênteses, do nome do fabricante, da cidade e do país em que foi fabricado, separados por vírgula. Para unidades de medida, deve-se utilizar o Sistema Internacional de Unidades. Palavras em outras línguas devem ser evitadas nos textos em português, utilizar preferentemente a sua tradução. Na impossibilidade, os termos estrangeiros devem ser grafados em itálico. Toda abreviatura ou sigla deve ser escrita por extenso na primeira vez em que aparecer no texto.

ESTRUTURA DO ARTIGO

PESQUISAS ORIGINAIS devem ter no máximo 20 páginas com até 40 citações; organizar da seguinte forma:

Título em português: caixa alta, centrado, negrito, conciso, com um máximo de 25 palavras;

Título em inglês (obrigatório): caixa alta, centrado. Versão do título em português;

Resumo: parágrafo único sem deslocamento, fonte tamanho 11, espaço 1, justificado, contendo entre 150 e 250 palavras. Deve conter a apresentação concisa de cada parte do trabalho, abordando objetivo(s), método, resultados e conclusões. Deve ser escrito sequencialmente, sem subdivisões. Não deve conter símbolos e contrações que não sejam de uso corrente nem fórmulas, equações, diagramas;

Palavras-chave: de 3 a 5 palavras-chave, iniciadas por letra maiúscula, separadas e finalizadas por ponto. Deverá ser consultada a lista de Descritores em Ciências da Saúde-DECS, que pode ser encontrada no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>

Abstract (obrigatório): fonte tamanho 11, espaço 1, justificado, deve ser a tradução literal do resumo;

Keywords: palavras-chave em inglês;

Introdução: deve apresentar o assunto a ser tratado, fornecer ao leitor os antecedentes que justificam o trabalho, incluir informações sobre a natureza e importância do problema, sua relação com outros estudos sobre o mesmo assunto, suas limitações. Essa seção deve representar a essência do pensamento do pesquisador em relação ao assunto estudado e apresentar o que existe de mais significativo na literatura científica. Os objetivos da pesquisa devem figurar como o último parágrafo desse item.

Método: destina-se a expor os meios dos quais o autor se valeu para a execução do trabalho. Pode ser redigido em corpo único ou dividido em subseções. Especificar tipo e origem de produtos e equipamentos utilizados. Citar as fontes que serviram como referência para o método escolhido.

Resultados: Nesta seção o autor irá expor o obtido em suas observações. Os resultados poderão estar expressos em quadros, tabelas, figuras (gráficos e imagens). Os dados expressos não devem ser repetidos em mais de um tipo de ilustração.

Discussão: O autor, ao tempo que justifica os meios que usou para a obtenção dos resultados, deve contrastar esses com os constantes da literatura pertinente; estabelecer relações entre causas e efeitos; apontar as generalizações e os princípios básicos, que tenham comprovações nas observações experimentais; esclarecer as exceções, modificações e contradições das hipóteses, teorias e princípios diretamente relacionados com o trabalho realizado; indicar as aplicações teóricas ou práticas dos resultados obtidos, bem como, suas limitações; elaborar, quando possível, uma teoria para explicar certas observações ou resultados obtidos; sugerir, quando for o caso, novas pesquisas, tendo em vista a experiência adquirida no desenvolvimento do trabalho e visando a sua complementação.

Conclusões: Devem ter por base o texto e expressar com lógica e simplicidade o que foi demonstrado com a pesquisa, não se permitindo deduções. Devem responder à proposição.

Agradecimentos (opcionais): O autor deve agradecer às fontes de fomentos e àqueles que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho. Agradecimento a suporte técnico deve ser feito em parágrafo separado.

Referências (e não bibliografia): Espaço simples entre linhas e duplo entre uma referência a próxima. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, deve estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma

resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Quando a obra tiver até seis autores, todos devem ser citados. Mais de seis autores, indicar os seis primeiros, seguido de et al. Alguns exemplos: Artigo publicado em periódico:

Lindsey CJ, Almeida ME, Vicari CF, Carvalho C, Yagui A, Freitas AC, et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet. Mol. Res.* 2009;8(1):310-8.

Artigo publicado em periódico em formato eletrônico:

Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte TS, Franco KL. Utilização do adesivo Metil-2-Cianoacrilato e fio de náilon na reparação de feridas cutâneas de cães e gatos [Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats]. *Ciência Rural* [Internet]. 2001 Apr [citado em 10 Out 2008;31(2):285-9. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000200015.

Instituição como autor:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust. 1996;164:282-4.

Artigo eletrônico publicado antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. Blood. 2002 Nov 15;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

Livro (como um todo)

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Capítulo de livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelshtein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

RELATOS DE CASO CLÍNICO

Artigos predominantemente clínicos, de alta relevância e atualidade. Os relatos de caso devem apresentar a seguinte estrutura: título em português; título em inglês; resumo em português; palavras-chave; abstract; keywords; introdução; relato do caso; discussão; conclusão e referências. Não devem exceder 12 páginas, incluídos os quadros, as tabelas e as figuras, com até 30 citações.

ARTIGOS DE REVISÃO

Poderão ser aceitos para submissão, desde que abordem temas de interesse, atualizados. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber. Devem ter até 20 páginas, incluindo resumos, tabelas, quadros, figuras e referências. As tabelas, quadros e figuras limitadas a 06 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. As referências bibliográficas devem ser limitadas a 60. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação.

Devem conter: título em português e inglês, resumo e abstract (de 150 a 250 palavras), palavras-chave/keywords, introdução, método, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (caso necessário), referências.

EDITORIAIS

Colaborações solicitadas a especialistas de áreas afins, indicados pela Conselho Editorial, visando analisar um tema de atualidade. Devem conter: Título em português e inglês, Autor, Palavras-chave, Keywords,

Texto em português, Referências (quando necessário). Os trabalhos não devem exceder a 2 páginas.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word (DOC ou DOCX).
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto do trabalho deve estar conforme as **NORMAS** da revista (em espaço 1,5, fonte 12 Time New Roman), Figuras e Tabelas inseridas no texto (logo após o seu chamamento, Figuras em resolução mínima de 300 DPI). Os trabalhos não devem exceder as 20 páginas em espaço 1,5. É importante ressaltar que pesquisas feitas com seres humanos e animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo respectivo Comitê de Ética. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. **ATENÇÃO:** trabalhos fora das Diretrizes para Autores não serão aceitos e serão devolvidos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em [Assegurando a avaliação pelos pares cega](#) foram seguidas.

Declaração de Direito Autoral

Os autores devem revisar o trabalho antes de enviá-lo, autorizando sua publicação na revista Ciência e Saúde on-line.

Devem declarar que o trabalho, nem outro substancialmente semelhante em conteúdo, já tenha sido publicado ou está sendo considerado para publicação em outro periódico, no formato impresso ou eletrônico, sob sua autoria e conhecimento. O referido trabalho está sendo submetido à avaliação com a

atual filiação dos autores. Os autores ainda concordam que os direitos autorais referentes ao trabalho se tornem propriedade exclusiva da revista Ciência e Saúde on-line desde a data de sua submissão. No caso da publicação não ser aceita, a transferência de direitos autorais será automaticamente revogada. Todas as afiliações corporativas ou institucionais e todas as fontes de apoio financeiro ao trabalho estão devidamente reconhecidas.

Por conseguinte, os originais submetidos à publicação, deverão estar acompanhados de Declaração de Direitos Autorais, conforme modelo:

DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Nós, abaixo assinados, transferimos todos os direitos autorais do artigo intitulado (título) à revista Ciência e Saúde on-line.

Declaramos ainda que o trabalho é original e que não está sendo considerado para publicação em outra revista, quer seja no formato impresso ou no eletrônico. Certificamos que participamos suficientemente da autoria do manuscrito para tornar pública nossa responsabilidade pelo conteúdo.

Assumimos total responsabilidade pelas citações e referências bibliográficas utilizadas no texto, bem como pelos aspectos éticos que envolvem os sujeitos do estudo.

Data:

Assinaturas

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor. Autorizo também a divulgação do arquivo no formato PDF no banco de monografias da Biblioteca institucional.

Raquel de Carvalho Marciano

Pindamonhangaba, dezembro de 2017.

