

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Esterases e Teste de Micronúcleo como biomarcadores para o monitoramento dos efeitos do organofosforado Temefós em *Poecilia reticulatus* Peters, 1859 (Poeciliidae)

Boscolli Barbosa Pereira

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Junho - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Esterases e Teste de Micronúcleo como biomarcadores para o monitoramento dos efeitos do organofosforado Temefós em *Poecilia reticulatus* Peters, 1859 (Poeciliidae)

Boscolli Barbosa Pereira

Warwick Estevam Kerr

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Junho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Esterases e Teste de Micronúcleo como biomarcadores para o monitoramento dos efeitos do organofosforado Temefós em *Poecilia reticulatus* Peters, 1859 (Poeciliidae)

Boscolli Barbosa Pereira

Dr. Warwick Estevam Kerr
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__.

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia de Campos Brites

Uberlândia - MG
Junho – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

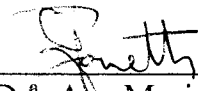
Esterases e Teste de Micronúcleo como biomarcadores para o monitoramento dos efeitos do organofosforado Temefós em *Poecilia reticulatus* Peters, 1859 (Poeciliidae)

Boscolli Barbosa Pereira

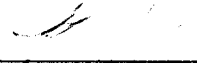
Aprovado pela Banca Examinadora em: 12 / 06 / 2007 Nota: 4



Dr. Warwick Estevam Kerr



Prof. Dr. Ana Maria Bonetti



Dr. Luiz Carlos Guilherme

Uberlândia, 01 de Junho de 2007.

RESUMO:

Os programas públicos que visam controlar o mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*, baseiam-se no uso de inseticidas industrializados como os organofosforados. Ao atingir os ambientes aquáticos, os organofosforados afetam os organismos alvo e não alvo, alterando a estrutura dos ecossistemas, matando, inclusive, os predadores naturais das larvas de *A. aegypti*. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do tratamento com diferentes exposições dose-tempo de Temefós (TE) em *Poecilia reticulatus*, por meio do Teste de Micronúcleo e da Análise de esterases. O Teste de Micronúcleo revelou que o incremento nas taxas de micronúcleos foi dose e tempo dependente, sendo que as maiores frequências foram observadas após 72 horas de exposição ao organofosforado. A análise esterásica mostrou que a enzima EST-1, classificada como uma carboxilesterase teve sua atividade mais elevada após 120 e 144 horas. Não foi revelada evidência estatística de correlação entre a atividade da enzima EST-1 e a frequência média de micronúcleos para o tratamento com TE (0,01 mg/L) nos períodos de exposição estudados ($r = 0,228652$; $P > 0,05$). Entretanto, uma correlação negativa, estatisticamente significativa ($r = -0,89046$; $P < 0,05$), ocorreu entre a frequência de micronúcleos e a atividade de EST-8 para o mesmo tratamento. O aumento significativo da expressão de EST-1 pode estar associado à diminuição das frequências de micronúcleos após 120 e 144 horas de exposição ao TE. A correlação negativa entre a expressão de EST-8, classificada como uma colinesterase, e a frequência de micronúcleos sugere que o organofosforado TE atua aumentando o efeito genotóxico e inibindo a atividade colinesterásica ao longo do tempo de exposição.

Palavras-chave: *Poecilia reticulatus* – biomonitoramento – esterases – micronúcleo – organofosforado.

INTRODUÇÃO:

As estratégias para o controle do principal vetor da dengue, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 estão fundamentadas na utilização de produtos químicos e biológicos integrado com programas de manejo ambiental. Os programas públicos que visam controlar o

mosquito utilizam vários inseticidas, dos quais se destacam os organofosforados e piretróides. O organofosforado temefós (TE), utilizado no controle de larvas de *Aedes*, tem sido empregado continuamente (Carvalho et al. 2004).

Os principais efeitos causados pelos organofosforados estão relacionados, primeiramente, à inibição da acetilcolinesterase, uma importante enzima do sistema nervoso que, quando inibida, provoca acúmulo de acetilcolina nas sinapses com conseqüente colapso do sistema nervoso, resultando na morte do organismo contaminado (Fulton & Key 2001). Os efeitos secundários, porém muito relevantes, são resultantes da genotoxicidade dos organofosforados. O efeito genotóxico é causado por lesões no DNA, incluindo quebras, bases modificadas e eventos de perdas de cromossomos durante a divisão celular (Kirsch-Volders et al. 2003).

O desenvolvimento de Biomarcadores baseados em respostas biológicas de organismos tratados com poluentes vem sendo amplamente utilizado para monitorar os efeitos da exposição à contaminantes (Garcia et al. 2000).

A inibição de colinesterases é um biomarcador muito utilizado para indicar os efeitos da exposição a inseticidas (Monteiro et al. 2005). Outro biomarcador amplamente empregado é o Teste de Micronúcleo (TMN). O TMN com peixes revelou ser uma eficiente técnica para determinar o potencial genotóxico de agentes químicos poluidores (Bolognesi et al. 1999, Grisolia & Starling 2001).

Inseticidas não afetam somente organismos alvos, como também provocam efeitos em outros organismos e até mesmo na espécie humana (Titenko-Holand et al. 1997). Ao atingir os ambientes aquáticos, os organofosforados afetam os organismos alvo e não alvo, alterando a estrutura dos ecossistemas, matando, inclusive, os predadores naturais das larvas de *A. aegypti* (Das & John 1999, Çakir & Sarikaya 2005, Piña-Guzmán et al. 2006). O uso freqüente de temefós pode selecionar populações de mosquitos resistentes ao inseticida (Karunaratne e Hemingway 2001), favorecendo com o aumento das populações de *A. aegypti*, dos índices de casos de dengue (Marcoris et al. 1999, Campos e Andrade 2001) e desestabilização dos ecossistemas que atingem.

Os efeitos dos inseticidas em animais não alvos vão desde alterações fisiológicas, relativamente simples, até a morte do organismo, entretanto, a exposição às concentrações subletais dessas substâncias pode induzir mudanças em níveis individuais,

que implicarão em alterações nos parâmetros populacionais. A energia empregada na detoxificação e o estresse causado pelas doses subletais causam mudanças no metabolismo do organismo, alterando a sobrevivência e reduzindo a reprodutividade das populações afetadas (Duquesne 2006).

Estudos que envolvem marcadores para contaminação individual, populacional e do ambiente são relevantes por fornecerem parâmetros que possibilitam avaliar e prever os efeitos da propagação de inseticidas em sistemas biológicos, mostrando os possíveis impactos em diversas populações.

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do tratamento com diferentes exposições dose-tempo de Temefós em *Poecilia reticulatus*, por meio do Teste de Micronúcleo (TMN) e da análise do perfil esterásico com caracterização de esterases pelo uso de inibidores específicos.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Material biológico

Os peixes (*Poecilia reticulatus*), popularmente conhecidos como “guppys”, utilizados neste trabalho são mantidos em reservatório artificial na Universidade Federal de Uberlândia. Para os testes de micronúcleo e de inibição da atividade esterásica, foram selecionados peixes de mesma idade (aproximadamente 60 dias), sexo, dieta, tamanho e peso. Os peixes destinados à análise de esterases foram decapitados e suas cabeças foram preservadas à temperatura de -80°C até o momento da análise.

Químicos

Amostras do inseticida organofosforado Temefós (Abate[®], Cianamida, Brasil) foram obtidas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia - MG.

Os inibidores sulfato de cobre 1 mM, malation 0,4 mM e sulfato de eserina 1 mM e os substratos α e β naftil-acetatos foram utilizados para caracterização e identificação das esterases.

Exposição Dose-Tempo

Foram preparados aquários com diferentes concentrações de TE. As concentrações testadas foram de 0.005, 0.01, e 0.02 (mg/L) e os tempos de exposição foram de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Para aclimatização, os peixes foram mantidos nos aquários por sete dias antes do tratamento, sob temperatura ambiente e pH controlado em 7,4.

Atividade esterásica em gel de poliacrilamida

As cabeças dos peixes tratados com TE e dos não tratados (Controle) foram maceradas em nitrogênio líquido e 400 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,5), contendo glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, sacarose 20%, EDTA 0,001 M e Triton X-100 0,5%. O sobrenadante obtido de centrifugação (4° C, 15.000 G, 15 min) foi removido e usado na análise das esterases. O conteúdo protéico das amostras foi determinado, em triplicata, pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão e realizando leitura a 595 nm em espectrofotômetro (*Ultrospec 1100 pro* – Amersham Biosciences). Foram aplicados 10 μ g de cada amostra no gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em quatro horas à 4° C, com voltagem constante de 100V e solução 0,1 M de tris-glicina (pH 8,3) como tampão de corrida. Após a realização da eletroforese, a atividade foi detectada pela incubação do gel por 60 min no escuro à 37° C em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5), contendo 3,2 mM de α e β naftil-acetatos e 2,4 mM de Fast Blue BB.

Caracterização das esterases

Para caracterização das esterases encontradas no gel de poliacrilamida, foram utilizados os inibidores sulfato de cobre 1 mM, malation 0,4 mM e sulfato de eserina 1 mM e os substratos α e β naftil-acetatos. Para cada inibidor, soluções estoque foram preparadas em água ultrapura ou etanol, conforme apropriado. De cada inibidor, 5 μ L de

cada solução estoque foi incubada com 495 μL do extrato enzimático por 30 min à 25 °C, antes da adição dos substratos. Foram feitos controles com água ultrapura e etanol.

O Teste de Micronúcleo

O sangue dos peixes foi coletado por punção caudal, utilizando seringa heparinizada com capacidade para 1 mL e agulha de parede fina (Udroiu 2006). Cada amostra foi imediatamente submetida à técnica de esfregaço em lâmina para microscopia de luz. O esfregaço foi fixado em metanol puro por 15 min, seguido de coloração com Giensa 10% solubilizado em tampão Sorensen (Na_2HPO_4 0,06 M; KH_2PO_4 0,06 M, pH 6,8) por 10 min. Foram analisados 2000 eritrócitos por indivíduo quanto à frequência de micronúcleos (MN). A frequência foi expressa em número de micronúcleos por mil eritrócitos analisados, em cada amostra. Foram aceitos como micronúcleos os fragmentos circulares que equivaleram à cerca de 1/3 do núcleo principal e que apresentaram mesma coloração, intensidade e estiveram desconectados deste.

Análise estatística

As frequências de micronúcleos nas diferentes doses de TE com tempos de exposição variáveis foram comparadas estatisticamente pela análise de variância (ANOVA, Tukey). Os valores de densidade óptica absoluta das bandas de esterase encontradas em todos os tempos de tratamento na dose diagnóstica de 0,01 mg/L foram comparados entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, Dunn. Para avaliar a correlação entre as taxas de MN e a expressão das esterases na dose diagnóstica de 0,01 mg/L de TE com exposição de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, foi aplicado o Teste de correlação de Pearson. Para todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes (Zar 1999).

RESULTADOS:

Teste de Micronúcleo

Verificando-se a frequência de micronúcleos nos diferentes tempos de exposição para cada dose, observa-se que no grupo Controle (sem tratamento com TE) as taxas de MN não variaram com o aumento dos tempos de exposição. Na dose de 0,5 mg/L, as maiores frequências de MN ocorreram com 72 e 96 horas de exposição ($P < 0,05$). Com o tratamento de 0,01 mg/L, as frequências de micronúcleos foram significativamente maiores com 72, 96 e 120 horas de exposição. Para o tratamento com TE na concentração de 0,02 mg/L, a maior frequência de micronúcleos ocorreu com 72 horas de exposição, sendo que estes valores diferiram significativamente das taxas apresentadas com 120 e 144 horas de exposição (Tabela 1).

A frequência média de micronúcleos nas diferentes doses de tratamento com TE para cada período de exposição foi semelhante nos diferentes tempos. As maiores quantidades de MN ocorreram no tratamento com TE na concentração de 0,02 mg/L, que diferiram, significativamente, das taxas apresentadas nas doses de 0,005 mg/L, 0,01 mg/L (estas não diferiram entre si) e do controle, que apresentou frequências médias estatisticamente inferiores às do grupo tratado com TE (Tabela 2).

Atividade Esterásica em gel de poliacrilamida

Como mostrado na Figura 1, apenas as bandas EST-1 e EST-8 foram detectadas em todos os tempos de exposição dos peixes à concentração diagnóstica de 0,01 mg/L de TE. Os valores de densidade óptica das bandas EST-1 e EST-8 foram determinados com pelo programa ImageMaster (Pharmacia Biossystem). As medidas das densidades ópticas de cada banda foram comparadas entre si quanto aos efeitos do tempo de exposição dos animais ao TE. A EST-1 apresentou atividade significativamente superior ao controle nas exposições de 120 e 144 horas, enquanto que a EST-8 apresentou atividade significativamente menor que o controle nas exposições de 72 e 96 horas (Tabela 3).

Tabela I. Frequência média de micronúcleos (média por 1000 células \pm Desvio Padrão) detectada em eritrócitos de *Poecilia reticulatus* nos diferentes tempos de exposição de cada dose de tratamento de TE.

Concentração de TE (mg/L)	Exposição (horas)					
	24	48	72	96	120	144
0,000	0.500 \pm 0.41 a	0.500 \pm 0.41 a	0.500 \pm 0.41 a	0.500 \pm 0.00 a	0.375 \pm 0.41 a	0.500 \pm 0.48 a
0,005	1.625 \pm 0.48 b	2.375 \pm 0.25 ab	2.625 \pm 0.48 a	2.625 \pm 0.48 a	2.375 \pm 0.25 ab	1.750 \pm 0.29 b
0,010	1.750 \pm 0.29 b	2.250 \pm 0.65 ab	2.875 \pm 0.25 a	2.750 \pm 0.29 a	2.625 \pm 0.48 a	2.250 \pm 0.29 ab
0,020	4.000 \pm 0.41 abc	4.500 \pm 0.41 ab	4.750 \pm 0.65 a	4.375 \pm 0.48 ab	3.750 \pm 0.29 bc	3.500 \pm 0.41 c

Médias com diferentes letras, na mesma linha, são significativamente diferentes (ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0,05$).

Tabela II. Frequência média de micronúcleos (média por 1000 células \pm Desvio Padrão) detectada em eritrócitos de *Poecilia reticulatus* nas diferentes doses de tratamento de TE para cada período de exposição.

Exposição (horas)	Concentração de TE (mg/L)			
	0,0	0,005	0,01	0,02
24	0.500 \pm 0.41 c	1.625 \pm 0.48 b	1.750 \pm 0.29 b	4.000 \pm 0.41 a
48	0.500 \pm 0.41 c	2.375 \pm 0.25 b	2.250 \pm 0.65 b	4.500 \pm 0.41 a
72	0.500 \pm 0.41 c	2.625 \pm 0.48 b	2.875 \pm 0.25 b	4.750 \pm 0.65 a
96	0.500 \pm 0.00 c	2.625 \pm 0.48 b	2.750 \pm 0.29 b	4.375 \pm 0.48 a
120	0.375 \pm 0.41 c	2.375 \pm 0.25 b	2.625 \pm 0.48 b	3.750 \pm 0.29 a
144	0.500 \pm 0.48 c	1.750 \pm 0.29 b	2.250 \pm 0.29 b	3.500 \pm 0.41 a

Médias com diferentes letras, na mesma linha, são significativamente diferentes (ANOVA, Teste de Tukey; $P < 0,05$).

Caracterização bioquímica das esterases

Para a caracterização das esterases EST-1 e EST-8, foram utilizados os inibidores sulfato de cobre 1 mM, malation 0,4 mM e sulfato de eserina 1 mM e os substratos α e β naftil-acetatos. O padrão de bandas não apresentou diferenças entre os diferentes substratos. A caracterização bioquímica por meio dos inibidores indicou que a enzima EST-1 é classificada como carboxilesterase, e que a EST-8 é classificada como uma enzima da classe das colinesterases.

Figura I. Gel de poliacrilamida mostrando as diferenças de expressão das esterases de peixes expostos à concentração diagnóstica de TE (0,01 mg/L). Os períodos de exposição ao TE são indicados no alto da figura.

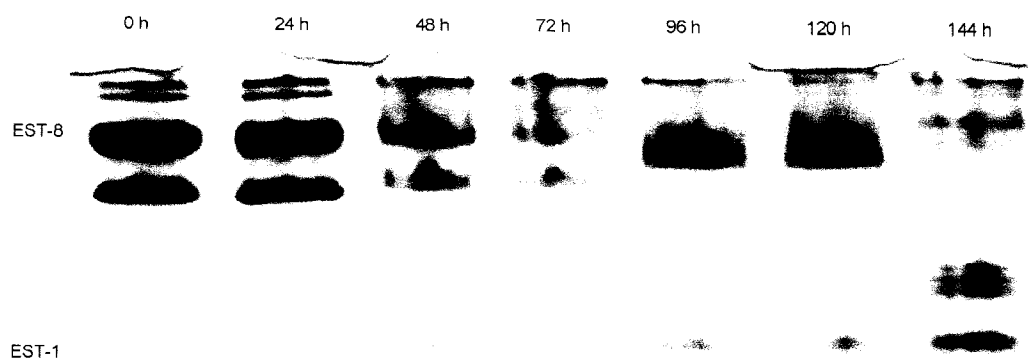


Tabela III. Variação na Densidade Óptica Absoluta (pixels) das bandas presentes em todos os tempos de exposição dos animais ao TE na concentração de 0,01 mg/L.

Exposição (horas)	Densidade Óptica Absoluta (pixels)		
	EST-1		EST-8
0	0,099 (0,100-0,088)	c	1139,688 (1143,600-1109,115) a
24	0,989 (1,121-0,965)	bc	973,195 (985,654-966,332) ab
48	53,922 (60,338-49,774)	abc	481,146 (490,665-458,481) abc
72	53,838 (56,488-48,382)	abc	391,906 (397,689-388,047) bc
96	76,150 (79,542-71,551)	abc	385,177 (387,210-374,997) c
120	99,296 (105,909-92,488)	ab	438,727 (444,202-433,696) abc
144	186,425 (194,210-177,916)	a	494,899 (527,696-488,595) abc

Medianas seguidas por diferentes letras, na mesma coluna, são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, Dunn; $P < 0,05$).

Correlação entre expressão de esterases e frequência média de micronúcleos

Não existe evidência estatística de correlação entre a atividade da enzima EST-1 e a frequência média de micronúcleos para o tratamento com TE (0,01 mg/L) nos períodos de exposição estudados ($r = 0,228652$; $P > 0,05$). Entretanto, uma correlação negativa, estatisticamente significativa ($r = -0,89046$; $P < 0,05$), ocorreu entre a frequência de micronúcleos e a atividade de EST-8 nas condições de dose e tempo de exposição citadas anteriormente (Figuras 2 e 3).

Figura II. Correlação de Pearson entre a expressão da enzima EST-1 e a frequência média de micronúcleos em *Poecilia reticulatus* ($r = 0,228652$; $P > 0,05$).

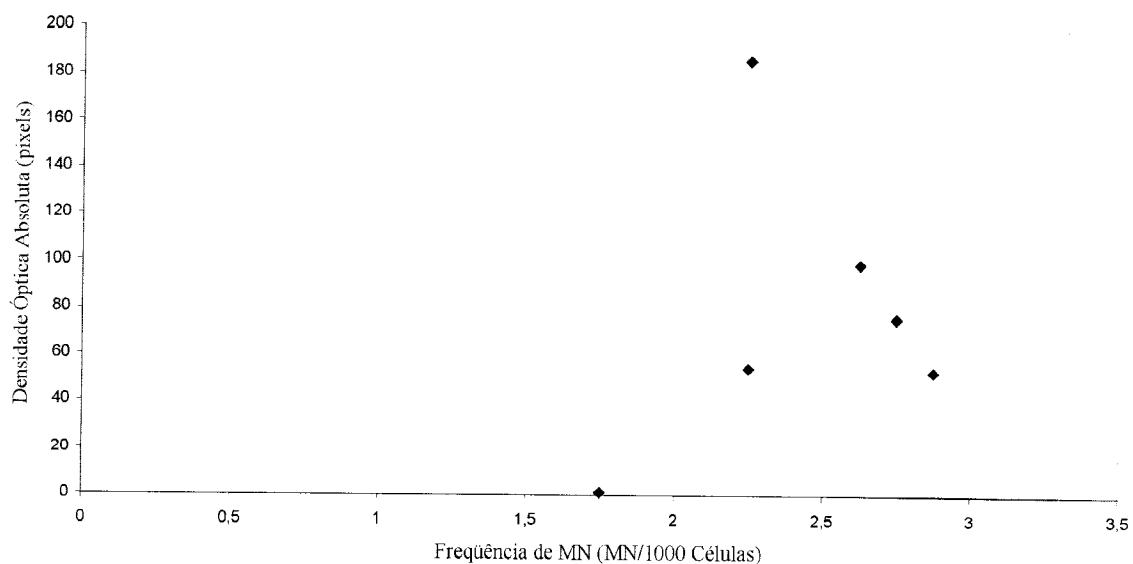
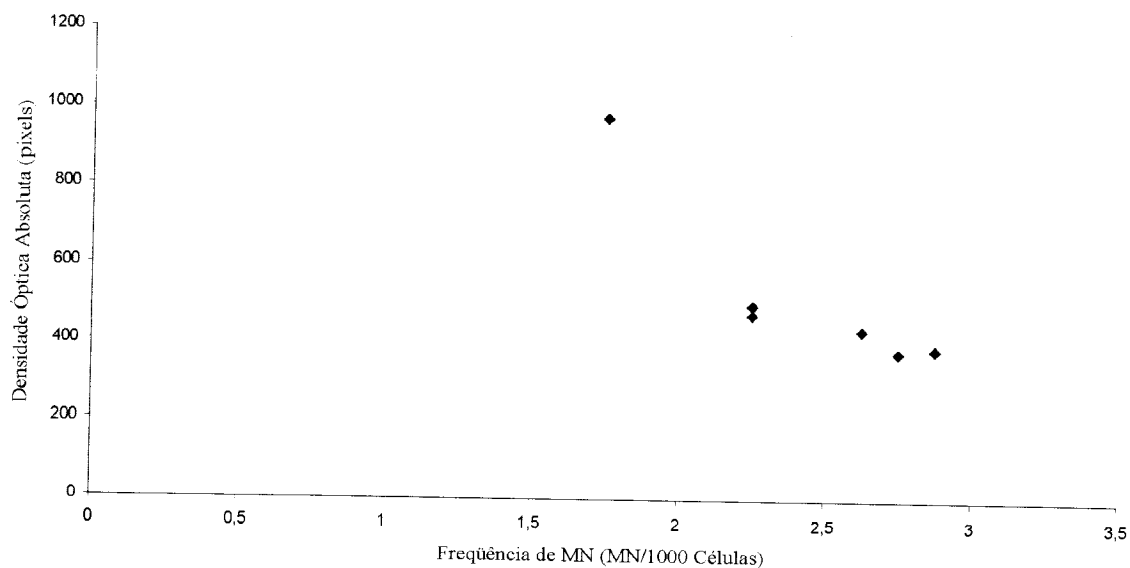


Figura III. Correlação de Pearson entre a expressão da enzima EST-8 e a frequência média de micronúcleos em *Poecilia reticulatus* ($r = -0,89046$; $P < 0,05$).



DISCUSSÃO:

O desenvolvimento de biomarcadores baseados no estudo de respostas biológicas de organismos à poluentes é uma ferramenta bioquímica essencial para a implementação de programas de monitoramento ambiental. (Fulton & Key 2001).

O Teste de Micronúcleo é utilizado para detectar quebras nos cromossomos durante a anáfase, que geram micronúcleos. É um teste importante por fornecer conhecimento dos efeitos clastogênicos causados por poluentes (Grisolia & Starling 2001).

Os resultados do Teste de Micronúcleo revelaram que o incremento nas taxas de micronúcleos foi dose e tempo dependente, sendo que as maiores frequências foram observadas após 72 horas de exposição ao organofosforado, enquanto que os resultados obtidos pela análise esterásica mostram que a enzima EST-1, classificada como uma carboxilesterase teve sua atividade elevada após 120 e 144 horas.

Inseticidas organofosforados são detoxificados por enzimas como as carboxilesterases, que agem reduzindo os níveis de organofosforado livre no organismo (Souza-Polezzi 2004). O aumento significativo da expressão de EST-1 pode estar

associado à diminuição das frequências de micronúcleos após 120 e 144 horas de exposição ao TE.

As exposições a concentrações subletais de organofosforados podem induzir mudanças em níveis individuais e populacionais nos organismos afetados. Individualmente, ocorrem alterações no metabolismo, especialmente provocadas por gasto extra de energia com processos de detoxificação, como a produção de carboxilesterases; produção de novas colinesterases e com a ativação de mecanismos de reparo no material genético danificado.

As implicações na dinâmica das populações afetadas, como alterações nas taxas de crescimento são conseqüências dos efeitos causados individualmente que afetam, por exemplo, a reprodução, devido aos efeitos genotóxicos que podem atingir as gônadas destes organismos (Duquesne 2006).

A correlação negativa entre a expressão de EST-8, classificada como uma colinesterase, e a frequência de micronúcleos sugere que o organofosforado TE atua aumentando o efeito genotóxico e inibindo a atividade da acetilcolinesterase ao longo do período de exposição.

AGRADECIMENTOS:

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia pelas amostras de inseticida organofosforado Temefós (Abate[®], Cianamida, Brasil).

REFERÊNCIAS:

Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabri R, Viarengo A 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environmental Molecular Mutagenesis* 33: 287-292.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- Çakir S, Sarikaya R 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology* 43: 443-450.
- Campos J, Andrade CFS 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista Saúde Pública* 35: 232-236.
- Das P, John G 1999. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters* 104: 11-116.
- Duquesne S 2006. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 145-150.
- Fulton MH, Key PB 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology Chemistry* 20: 37-45.
- Garcia LM, Castro B, Ribeiro R, Guilhermino L 2000. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers* 5: 274-284.
- Grisolia CK, Satarling FLRM 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research* 491: 39-44.
- Karunaratne SHPP, Hemingway J 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organization* 79: 1060-1064.

- Kirsch-volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate Jr.M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surralles J, Vanhauwaert A, Wakata A 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research* 540: 153-163.
- Marcoris MLG, Andrighetti MT, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Saúde Pública* 33: 521-522.
- Monteiro M, Quintaneiro C, Morgado F, Soares AMVM, Guilhermino L 2005. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 341-347.
- Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta, M, Quintanilla-Veja B 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216: 216-224.
- Titenko-Holand N, Windham P, Kolachana F, Reinisch S, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research* 388: 85-95.
- Sousa-Polezzi RC, Bicudo HEMC 2004. Effect of Phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 275-283.

Udroiu I 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79: 201-204.

Zar J 1999. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Upper Saddle River- NJ: Prentice-Hall.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ISSN 0074-0276 *versão*

impressa

ISSN 1678-8060 *versão on-*

line

Objetivos e política editorial

As **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos.

A submissão de um manuscrito às **Memórias** requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão

imediatamente devolvidos.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as **Memórias**. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**:

- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.
- Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já aceito, deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail (revista@ioc.fiocruz.br / revista@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: título corrente, título, nomes dos autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Patrocínios devem ser mencionados em nota de rodapé na primeira página.

Resumo: Com até 300 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves), o resumo deve apresentar os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos (seleção dos temas de estudo ou animais de laboratório; métodos analíticos ou de observação), as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível), e as principais conclusões. Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: Devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do *Index Medicus*.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e métodos: Deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: Ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Não citar os nomes ou iniciais dos pacientes ou registros de hospitais, especialmente nos materiais ilustrativos. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: Devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: Deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis

devem ser incluídas.

Agradecimentos: Devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: Devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus*. Consultar a List of Journals Indexed no *Index Medicus* publicada no número de janeiro do *Index Medicus* ou no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

- No texto, usar o sobrenome dos autores e a data:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

- No final do trabalho, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst*

Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Livro ou Tese

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London. p. 390-398.

Tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Para outras informações, consultar as **Instruções aos Autores** publicadas no primeiro número de cada volume da revista.

© 1997-2007 Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365

21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil

Tel.: +55 21 2598-4335

Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442

eMail