

JOÃO LUIZ TAVARES MENDES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A OBESIDADE E TRATADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Tubarão

2017

JOÃO LUIZ TAVARES MENDES

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A OBESIDADE E TRATADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Medicina da
Universidade do Sul de Santa Catarina como
requisito parcial ao grau de Médico.

Orientadora: Profa^a. Gislaine Tezza Rezin, PhD

Tubarão

2017

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito das nanopartículas de ouro sobre o peso corporal de camundongos submetidos a obesidade.	12
Figura 2. Efeito das nanopartículas de ouro sobre o peso da gordura mesentérica de camundongos submetidos a obesidade.	12
Figura 3. Efeito das nanopartículas de ouro sobre a glicemia de camundongos submetidos a obesidade.	13
Figura 4. Efeito das nanopartículas de ouro sobre a marcadores bioquímicos de camundongos submetidos a obesidade.	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 MÉTODOS.....	7
2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	7
2.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO	7
2.5 DESENHO EXPERIMENTAL	8
2.6 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO	9
2.7 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE BIOQUÍMICAS.....	10
2.8 MÉTODOS DE PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	10
3 RESULTADOS	11
4 DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS	19
ANEXO.....	22

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A OBESIDADE E TRATADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO**

**BIOCHEMICAL PARAMETERS EVALUATION IN MICE SUBMITTED TO
OBESITY AND TREATED WITH GOLD NANOPARTICLES IN MICE**

João Luiz Tavares Mendes¹. Gislaine Tezza Rezin²

¹ Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Tubarão, SC, Brasil.

² Professora no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Tubarão, SC, Brasil.

Endereço para correspondência:

Nome: João Luiz Tavares Mende

Rua: Altamiro Guimaraes, nº 632, bairro centro, Tubarão, SC, Brasil.

CEP: 88701-300

Telefone: +55 (048) 98809-5941

Email: joaoluiztmendes@gmail.com

Instituição:

Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL

Endereço: Avenida José Acácio Moreira, nº 787, Tubarão, SC, Brasil.

CEP: 88704-900

Telefone: +55 (048) 3621-3363

Fonte de financiamento e conflito de interesses:

Sem financiamento. Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

RESUMO

Objetivo: A obesidade é uma doença crônica que está associada a inflamação, estresse oxidativo e alterações hormonais. O aumento anual da prevalência dessa doença, associado aos enormes gastos públicos, refletem na necessidade de exploração de novas medidas terapêuticas a fim de diminuir as comorbidades relacionadas a essa doença. Devido as suas propriedades anti-inflamatórias, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da administração de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos de camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. **Métodos principais:** Camundongos Swiss foram randomizados em um grupo controle tratado com salina, grupo controle tratado com GNPs, grupo obeso tratado com salina e grupo obeso tratado com GNPs. O grupo controle foi alimentado com dieta normolipídica, e o grupo obeso com dieta hiperlipídica. Através de técnicas padronizadas, foram sintetizadas GNPs esféricas de tamanho médio de 18nm, e administradas de forma intraperitoneal diariamente nos grupos de estudo; nos grupos controles foi administrado solução salina. Foi avaliado ganho de peso dos animais semanalmente. No fim do experimento, foi avaliado alterações bioquímicas relacionadas a obesidade e ao uso de GNPs. **Resultados:** Foi observado aumento do peso corporal total e do peso da gordura mesentérica dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, comparados ao grupo controle. Quanto aos parâmetros bioquímicos, foi observado diminuição dos níveis glicêmicos dos animais obesos tratados com salina, comparado ao controle. Nos animais obesos e tratados com GNPs, a glicemia se assemelha ao grupo controle, sugerindo que as GNPs revertem a alteração glicêmica causada pela dieta hiperlipídica. Não se observou diferença nos níveis de triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL. **Relevância:** Pode ser observado que o uso de nanopartículas de ouro não causa interações nos parâmetros bioquímicos avaliados.

Palavras chave: obesidade; nanopartículas de ouro; colesterol; Glicemia.

1 INTRODUÇÃO

O sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo anormal de gordura, de tal forma que possa oferecer risco a saúde do indivíduo[1]. A condição de obesidade é configurada como uma doença crônica associada a múltiplos fatores e a caráter genético, além de estar relacionada a outros elementos como o estilo de vida do indivíduo, fatores psicológicos, dietéticos, ambientais e físicos, consequentemente, tornando essa patologia extremamente complexa[2, 3, 4].

O consumo excessivo de alimento que resulta em um desbalanço energético, altera as funções do tecido adiposo, que se baseia principalmente na síntese e regulação hormonal[5, 6]. O depósito exagerado de tecido adiposo age liberando citocinas inflamatórias, e assim, recrutando células do sistema imune do indivíduo. Como o estímulo para o recrutamento dessas células inflamatórias não cessa, é observado um baixo grau de inflamação crônica em pacientes obesos[7, 8, 9, 10].

Outras alterações prevalentes na obesidade são observadas nos parâmetros bioquímicos; níveis de glicose, triglicerídeos[6], colesterol e suas frações, apresentam-se significativamente alterados quando comparados a não obesos[11, 12]. Uma elevação no índice de glicose reflete em um estado de hiperinsulinemia, que é comprovadamente um risco para doenças coronarianas[13, 14]. Assim sendo, as dislipidemias se configuram como um alto fator de risco para doenças cardiovasculares, principalmente pela relação existente entre obesidade e modificação de fatores bioquímicos lipídicos[15, 16].

Dos medicamentos aprovados para o tratamento da obesidade, muito se questiona sobre sua eficácia e segurança. A maioria desses medicamentos não apresentam resultados satisfatórios na redução de peso em curto espaço de tempo e ainda na manutenção de peso a longo prazo, além dos variados efeitos colaterais e restrições que impossibilitam a utilização desses fármacos para toda a população[17, 18]. Tendo em vista essas incertezas quanto ao tratamento medicamentoso, o método que ainda é mais utilizado e mais seguro é a associação de dieta balanceada com atividade física[19].

Pesquisas recentes têm demonstrado que o uso de medicamentos anti-inflamatórios na obesidade, tem efeito positivo na perda de peso[20]. A nanotecnologia tem se destacado como uma nova opção para diversos tratamentos na área da saúde, por exemplo, no transporte de fármacos ativos e imagens médicas[21]. Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas de ouro (GNPs) possuem propriedades terapêuticas reconhecidas, principalmente em processos inflamatórios como lesões musculares inflamatórias[22] e

artrites[23], reduzindo nestes casos marcadores inflamatórios, o que seria relevante no tratamento da obesidade. Desse modo, visando o potencial anti-inflamatório das GNPs, desperta-se interesse para o seu uso, isoladas ou associadas a farmacos, em estudos envolvendo a obesidade, a fim de avaliar seus efeitos nas alterações patológicas dessa doença.

Por ser a obesidade uma doença de alta prevalência e de grande impacto para a saúde, com muitas lacunas na sua fisiopatologia e no seu tratamento, desperta o interesse e a necessidade de desenvolver novas formas de tratamento. Considerando estudos atuais que indicam um estado de inflamação e descontrole neural do comportamento alimentar, propõe-se avaliar os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL em camundongos submetidos ao modelo animal de obesidade e tratados com nanopartículas de ouro.

2 MÉTODOS

2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando inicialmente entre 30-40g, procedentes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), os quais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ no biotério da UNISUL. O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), sob o protocolo 16.018.4.01.IV. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996) [24], assim como a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), publicada em 2016 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) [25].

2.4 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O procedimento experimental foi realizado no biotério da UNISUL e as posteriores análises no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Bloco da Saúde, UNISUL, Tubarão (SC).

2.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Esse estudo experimental teve início com um protocolo de indução de obesidade, aplicado em camundongos com 40 dias de idade. O tempo de indução foi de 10 semanas, a contar a partir do dia de implantação da dieta hiperlipídica. Após a oitava semana, foi administrado GNPs esféricas de tamanho médio de 18nm, durante 14 dias, uma vez ao dia.

O tempo de indução da obesidade em camundongos por dieta hiperlipídica foi determinado a partir de uma média com base em análise de trabalhos já publicados. Levando em conta que existe muita variabilidade nos estudos publicados, e que na maioria deles o tempo varia de 8 a 12 semanas[26, 27, 28], a indução do modelo animal de obesidade foi padronizada em 10 semanas para o nosso estudo.

O protocolo para indução da obesidade e a composição das dietas foram baseados em estudos prévios[29, 30]. Os animais tiveram livre acesso à água e ração (normolipídica ou hiperlipídica) durante o experimento.

Inicialmente os animais foram pesados e pareados em 2 grupos de igual número:

- Dieta normolipídica (grupo controle) (n=20);
- Dieta hiperlipídica (grupo obeso) (n=20).

Os camundongos foram mantidos neste regime por 8 semanas e pesados semanalmente. A ração hiperlipídica foi adquirida de empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda – ME). Os dois tipos de ração (normolipídica e hiperlipídica) foram adquiridos da mesma empresa, visto que os ingredientes e a quantidade de micronutrientes poderiam variar de uma marca de ração para outra e isso poderia interferir nos resultados do estudo. Além disso, a ração do grupo normolipídico teve os mesmos ingredientes da ração hiperlipídica, com exceção da banha de porco, fonte de gordura saturada utilizada para induzir obesidade.

É recomendado na literatura científica que não se utilize ração padrão para roedores comumente utilizada em biotério (feita com farelo de trigo, milho, soja, entre outros cereais) para os animais do grupo controle em experimentos para induzir obesidade com dieta rica em gordura, visto que ela não é comparável com os ingredientes das dietas hiperlipídicas que são geralmente utilizadas[31]. A dieta hiperlipídica fornece mais calorias e possui maior percentual de gordura saturada que a dieta padrão. O percentual de gordura saturada em torno de 60% na dieta hiperlipídica é preconizado para a indução da obesidade em camundongos[32, 33].

Com estes dados foi verificada diferença estatística no peso do grupo controle comparado com o grupo obeso, na oitava semana. Logo após, os camundongos foram randomizados em grupos 4 diferentes grupos para o tratamento com GNPs esféricas de tamanho médio de 18nm. Os camundongos foram randomizados em 4 grupos distintos; um grupo controle que recebeu administração de solução salina, um grupo controle que recebeu administração de nanopartículas de ouro, um grupo obeso que recebeu administração de solução salina e outro grupo obeso que recebeu administração de nanopartículas de ouro.

Após 8 semanas de indução de obesidade, os animais receberam, uma vez ao dia, por período de 2 semanas, administrações intraperitoneais de solução salina ou GNPs de 18 nm na concentração de 70mg/L (70mg/kg), usando-se uma seringa de insulina de 1 mL. Durante este período os animais continuaram sendo pesados semanalmente. No final do experimento foi feita uma coleta de sangue por punção cardíaca, onde os camundongos foram anestesiados com quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por injeção intraperitoneal. O ato de puncionar e retirar sangue do coração dos animais já acarretou a morte dos mesmos.

2.6 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

GNPs de tamanhos médios de 18nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e colaboradores[34] com pequenas modificações[35], a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4). Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi empregado como agente redutor e estabilizante. O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado utilizando-se uma concentração adequada do agente redutor.

Inicialmente, 100 mL de solução 0,50 mM de ácido tetracloroáurico foi aquecida em balão de fundo redondo até 90 °C sob agitação à 700 rpm. Uma solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema mantido sob refluxo e agitação a 200 rpm durante 20 minutos. O meio reacional foi resfriado naturalmente até temperatura ambiente e pH da solução ajustado ao pH fisiológico com solução tampão. A seguir, a solução foi centrifugada (13.000 rpm por 15 min) e o sobrenadante removido. As GNPs foram lavadas duas vezes com água ultrapura e novamente dispersa em salina para uso.

Após a síntese, a solução de GNPs foi caracterizada empregando-se a técnica de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Visível), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR). Para a espectrometria de UV-Visível, a medição da banda de SPR foi realizada à temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL da solução, sendo que o espectro eletrônico da

solução foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção.

Para medidas de difratometria de Raios-X (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNPs foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra, e seco em estufa. As análises foram efetuadas num difratômetro de raios-X.

A caracterização morfológica das nanopartículas empregadas neste estudo foi efetuada com auxílio de um microscópio de transmissão eletrônica. As amostras foram preparadas da seguinte forma: imediatamente após a síntese, uma alíquota de solução de GNPs foi diluída até absorbância inferior a 0,10 e transferida para um micro tubo que será mantido em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, um porta-amostra de cobre foi imerso na solução e deixado secar ao ar por 12 horas. A curva de distribuição de partículas foi efetuada selecionando-se uma região do porta-amostras contendo GNPs bem dispersas.

O potencial Zeta das soluções de GNPs foi medido mantendo a temperatura a 25°C. A concentração de ouro nas soluções de GNPs foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um Espectrômetro de Absorção Atômica.

2.7 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE BIOQUÍMICAS

Os camundongos foram anestesiados com quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por injeção intraperitoneal. As amostras de sangue de aproximadamente 1ml foram coletadas por punção cardíaca e armazenadas em tubo com ativador de coágulo. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (1120 G por 10 minutos) e o soro armazenado em microtubos a -80°C. Posteriormente, foram realizadas as dosagens em duplicata de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL no espectrofotômetro semi-automático (BioPlus 2000) através de kits comerciais específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo a recomendação do fabricante.

- Kit de Glicose Liquiform Vet referencia: 1012-1/100 (Labtest)
- Kit de Colesterol Total Liquiform 76-2/100 (Labtest)
- Kit de HDL - 145-1/80 (Labtest)
- Kit Triglicerídeo- Liquiform 87-2/100 (Labtest)

2.8 MÉTODOS DE PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

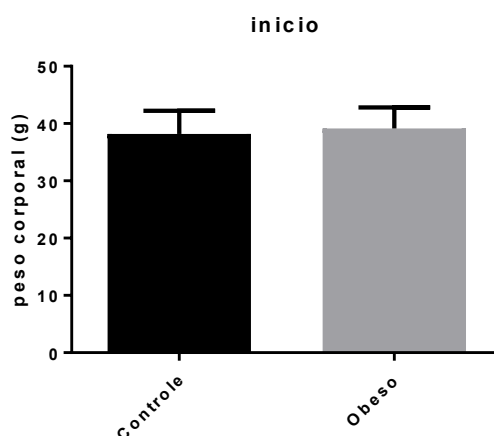
A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *Statistical Package for the Sciences* (SPSS). Os dados foram avaliados pela análise de variância de uma

via (ANOVA), seguido pelo *post hoc* Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Em nosso estudo experimental, os 40 camundongos estudados foram inicialmente pareados em 2 grupos, um grupo controle e um grupo de estudo, para iniciar o processo de indução à obesidade com base numa dieta hiperlipídica. Após permanecerem 8 semanas desse modo, o grupo controle que vinha recebendo dieta normolipídica e o grupo obeso que vinha recebendo dieta hiperlipídica, foram novamente subdivididos a fim de que se iniciasse com as administrações de nanopartículas. Durante 14 dias foram administrados as GNPs nos grupos selecionados, 1 vez ao dia, para posterior morte. No término do período experimental, foi observado as possíveis alterações bioquímicas relacionadas ao uso das GNPs.

Conforme verifica-se na figura 1, os resultados mostraram que na oitava semana de experimento os animais que receberam dieta hiperlipídica (grupo obeso) obtiveram um ganho de peso maior que o grupo que recebeu dieta normolipídica (grupo controle) ($p < 0,05$). No fim do experimento, ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica permaneceram com peso significativamente maior que os grupos controles que receberam dieta normolipídica, demonstrando também que a administração de GNPs não promoveu alterações no ganho de peso.



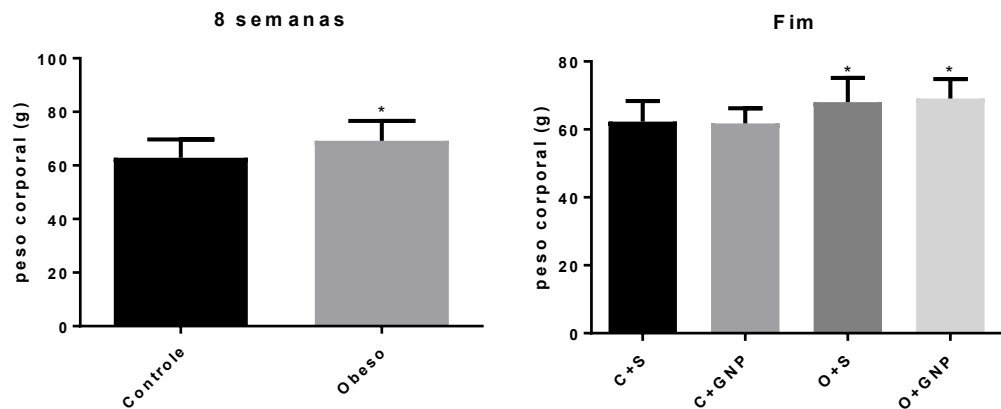


Figura 1. Efeito das nanopartículas de ouro sobre o peso corporal de camundongos submetidos a obesidade. C+S: controle + solução salina. C+GNP: controle + nanopartículas de ouro. O+S: obeso + solução salina. O+GNP: obesos + nanopartículas de ouro.

Em nosso estudo, como elucidado na figura 2, os animais que foram alimentados com dieta hiperlipídica tiveram gordura mesentérica significativamente mais pesada que o grupo controle que recebeu dieta normolipídica. Dentro do grupo de camundongos obesos, podemos observar que o grupo tratado com nanopartículas de ouro apresentou a gordura mesentérica mais pesada que o grupo obeso tratado com solução salina. Já dentro do grupo controle, observamos uma tendência a diminuição do peso da gordura mesentérica após o uso das GNPs.

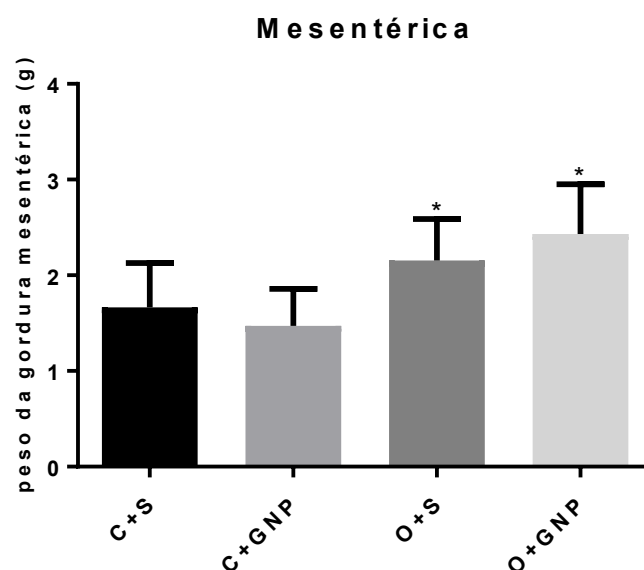


Figura 2. Efeito das nanopartículas de ouro sobre o peso da gordura mesentérica de camundongos submetidos a obesidade. C+S: controle + solução salina. C+GNP: controle + nanopartículas de ouro. O+S: obeso + solução salina. O+GNP: obesos + nanopartículas de ouro.

Referente a alterações glicêmicas dos camundongos, percebe-se na figura 3 que os animais do grupo de obesos tratados com solução salina apresentaram níveis glicêmicos abaixo dos demais grupos avaliados, demonstrando, ainda, diferença estatística quando comparado ao grupo controle.

Dessa forma, primeiramente é possível fazer uma comparação glicídica entre o grupo controle e o grupo de obesos. Nota-se que não foi possível obter uma diminuição na glicemia ao utilizar GNPs em camundongos obesos, ao par de que houve uma redução em obesos com solução salina.

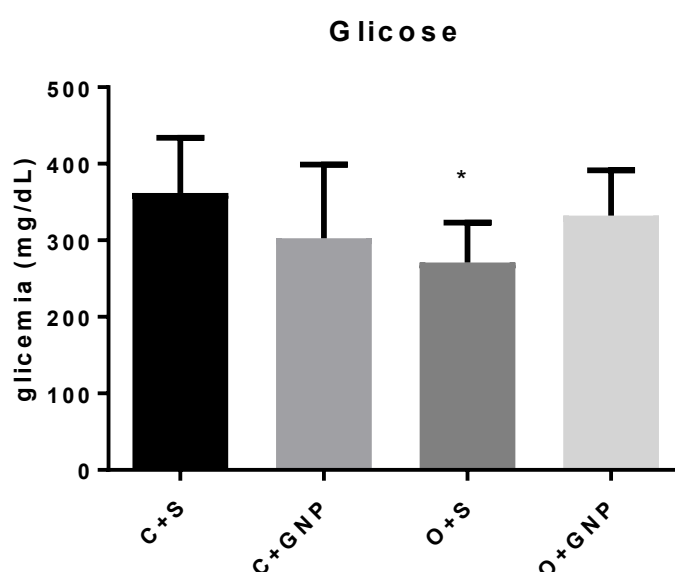


Figura 3. Efeito das nanopartículas de ouro sobre a glicemia de camundongos submetidos a obesidade. C+S: controle + solução salina. C+GNP: controle + nanopartículas de ouro. O+S: obeso + solução salina. O+GNP: obesos + nanopartículas de ouro.

Em relação as concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL e colesterol HDL, como apresentado nos gráficos delineados na figura 4, não houve diferença estatística entre os grupos estudados após o final do experimento.

O grupo controle e o grupo obeso obtiveram dados semelhantes, demonstrando que assim como na glicemia, as GNPs podem não ter efeito sobre esses parâmetros bioquímicos relacionados a obesidade.

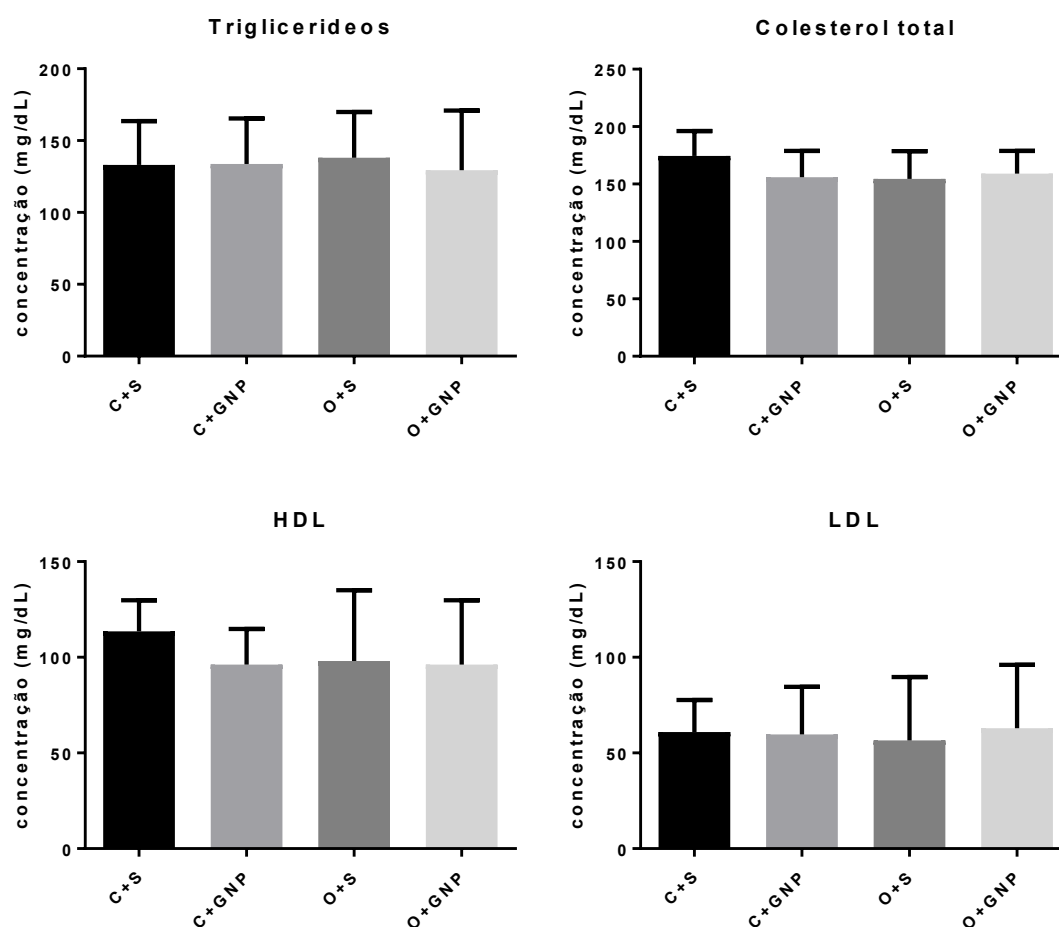


Figura 4. Efeito das nanopartículas de ouro sobre a marcadores bioquímicos de camundongos submetidos a obesidade. C+S: controle + solução salina. C+GNP: controle + nanopartículas de ouro. O+S: obeso + solução salina. O+GNP: obesos + nanopartículas de ouro.

4 DISCUSSÃO

Devido ao aumento da ingestão alimentar calórica, sedentarismo e um estilo de vida preconizado em que se verifica uma tendência a consumo de alimentos de alta carga calórica, o número de pacientes obesos vem aumentando com o passar dos anos. Associado a isso, crescem problemas relacionados diretamente com a obesidade, suas comorbidades, principalmente relacionado ao aumento de risco cardiovascular. Em consequência, é de grande importância encontrar um tratamento efetivo para a obesidade, a fim de diminuir suas complicações associadas.

A nanotecnologia, especificamente as nanopartículas de ouro, possuem um papel antiinflamatório já reconhecido, que teoricamente atuaria num importante mecanismo de inflamação que está presente em pacientes obesos [22, 23]. Todavia, pouco ainda se discute e se sabe sobre os reais efeitos sistêmicos das nanopartículas de ouro e em que áreas elas atuam

definidamente. Nesse estudo foi avaliado o efeito da administração de nanopartículas de ouro, composto com propriedades anti-inflamatórias, sobre peso corporal, peso da gordura mesentérica, glicemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Relativo ao peso dos animais, os resultados mostraram que os animais que receberam dieta hiperlipídica (grupo obeso) obtiveram um ganho de peso maior que o grupo que recebeu dieta normolipídica (grupo controle). Tendo como base os valores de peso da oitava semana, podemos inferir que o tratamento com as GNPs não influenciou no ganho de peso ao final das 10 semanas (Figura 1).

O efeito das nanopartículas de ouro no peso dos camundongos (ou a falta de efeito) é observado já em alguns estudos, como o de Chen e colaboradores[36], no qual teve avaliado, dentre diversos parâmetros, a alteração no peso de ratos após uma única administração via intraperitoneal de GNPs esféricas de tamanho médio de 21nm na dose de 7,85 µg/g de peso, nos períodos de 1h, 24 e 72h. De forma geral, apesar da falta de estudos com similaridade metodológica, observa-se que não há evidências na literatura de que a administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro influencie de alguma forma na saciedade e assim promover alterações no ganho de peso. Considerando como fator limitante na perda de peso, podemos pensar em relação ao pouco tempo de administração utilizado, estudos com períodos de administração mais longos se fazem necessários para elucidar esse mecanismo e se o papel antiinflamatório das nano atuam na perda de peso.

Avaliando outros estudos similares ao nosso experimento, têm-se o de Moretto e colaboradores[37], que embora não se tenha realizado a administração de nanopartículas de ouro, foram avaliados diversos parâmetros que se apresentam alterados em camundongos obesos após uma indução a obesidade de 12 semanas por dieta hiperlipídica. Um dos parâmetros avaliado nesse estudo foi o ganho ponderal após a indução a obesidade, obtendo diferença estatística entre o grupo controle e obeso já após as 2 primeiras semanas do experimento, e aumentando gradativamente até a 12ª semana. Dados que vem ao encontro dos resultados observados também em nosso estudo. Além do aumento do peso total, foi apresentado elevação do peso da gordura perigonadal e retroperitoneal, gorduras que não foram avaliadas em nosso experimento.

O aumento da gordura mesentérica é outro indicador que se pode utilizar para avaliar obesidade[38]. Em nosso estudo, os animais que foram alimentados com dieta hiperlipídica e receberam tanto solução salina, quanto as nanopartículas de ouro, apresentaram aumento do peso da gordura mesentérica quando comparados aos seus respectivos controles.

Além de alteração no peso dos animais, no estudo paulista supracitado foi observado elevação do peso da gordura perigonadal e retroperitoneal, gorduras que não foram avaliadas em nosso experimento; contudo, podemos associar com o aumento da gordura mesentérica que foi observado em nosso estudo, tendo reflexo na elevação do peso.

Outro parâmetro medido no estudo de Moretto[37] foi a glicemia. No final do estudo foi observado diferença estatística na glicemia dos grupos avaliados, tendo uma média de 157mg/dL no grupo controle, contra 215mg/dL no grupo obeso. Diferentemente do experimento comparado, no presente estudo não obtivemos diferença estatística quando avaliamos os grupos que receberam nanopartículas de ouro. Por outro lado, foi observado diferença entre o grupo obeso que recebeu administração de solução salina, comparado ao seu grupo controle. Os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram valores glicêmicos abaixo dos animais que receberam dieta normolipídica.

Podemos avaliar esse achado como um passo além para elucidarmos os mecanismos de ação das nanopartículas de ouro e sua influência no metabolismo, nesse caso particularmente, atuando sobre a secreção de insulina. Storlien e colaboradores[39] evidenciaram que a ingesta de uma dieta rica em gorduras contribui significativamente para o acúmulo de gordura e alterações na secreção de insulina. No animal obeso, a dieta predominantemente hiperlipídica e o acúmulo de gordura refletem num processo inflamatório crônico que, por conseguinte, atua no organismo estimulando a secreção e o predomínio de elevados níveis de insulina[40, 41], o que refletiu, em nosso estudo, em baixos níveis glicêmicos.

Como já é sabido que as GNPs diminuem marcadores inflamatórios[36], podemos inferir que com a diminuição do processo inflamatório, ocorreu concomitantemente a diminuição da secreção insulínica dos animais que receberam as nanopartículas de ouro, e assim a quantidade de insulina circulante foi mais baixa, fato corroborado pelos níveis glicêmicos encontrados no obeso + GNPs, que foi semelhante ao seu grupo controle.

No animal obeso tratado com solução salina, o grau de inflamação encontrado é mais alto e, conseqüentemente, a secreção de insulina também. Basicamente o metabolismo atua, nesses casos, elevando a produção pancreática de insulina a fim de diminuir a glicemia decorrente da dieta hiperlipídica. Infelizmente, não dosamos as concentrações séricas de insulina circulante em nosso estudo, fato que comprovaria nossa hipótese de mecanismo de ação. Outro ponto a considerar na divergência glicêmica observado no estudo de paulista, seria o fato da idade inicial dos camundongos ser mais elevada, e também ao tempo de indução a obesidade pela dieta hiperlipídica, sendo também maior e de 12 semanas.

Relativo aos valores de colesterol e triglicerídeos, neste estudo não foram observadas alterações de suas concentrações após a administração de nanopartículas de ouro. Assim como em nosso estudo, Muller e colaboradores[42] também não observaram alterações nesses mesmos parâmetros, após a administração intraperitoneal de nanopartículas de ouro durante 21 dias em ratos Wistar machos.

A falta de variação nos valores séricos de triglicerídeos vai ao encontro a variação de peso observado em nosso estudo. Uma vez que na obesidade, o excesso de substrato, adquirido através de uma alta ingesta energética, é armazenado na forma de triglicerídeos em células denominadas adipócitos[43], que formam o tecido adiposo[2]. O tecido adiposo responde ao consumo em excesso de nutrientes pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Logicamente, a não alteração dos valores de triglicerídeos, corrobora que o excesso de calorias ingerido foi armazenado na forma de tecido adiposo, contribuindo para a elevação do peso da gordura e do peso total do animal.

Na literatura é unânime a relação existente entre os altos níveis de colesterol sérico e a incidência de doenças arteriais, especialmente a aterosclerose, por isso a importância de pesquisarmos esses parâmetros em estudos referentes a obesidade[44, 45]. Todavia, não foram localizados estudos que avaliassem o efeito das nanopartículas de ouro sobre o colesterol LDL e o HDL em camundongos obesos. Em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas entre o grupo controle e o grupo obeso, e ainda, as nanopartículas de ouro mostraram não influenciar na concentração sérica dessas substâncias. Portanto esse é o primeiro estudo a relatar que as GNPs não interferem nos níveis séricos dessas substâncias.

Cliffon e colaboradores[46] sugerem que o tipo de dieta utilizado pouco influencia nos níveis de colesterol sérico; sendo eles determinados quase que exclusivamente pela atividade metabólica, reflexo da carga genética do indivíduo e de sua idade e sexo. Fato que corrobora os achados de nosso estudo, uma vez que tanto os camundongos alimentados com dieta normolipídica, quando os alimentados com hiperlipídica, mantiveram níveis séricos de LDL e HDL semelhantes.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos nessa tese de conclusão de curso contribuem para elucidar mecanismos pelos quais as nanopartículas de ouro podem interferir

no metabolismo e em alterações causadas pelo consumo de uma dieta hiperlipídica. Não se foi observado influência das nanopartículas de ouro com relação aos parâmetros bioquímicos avaliados nesse estudo, porém se faz necessário a necessidade de estudos como esse a fim de comprovar a não interação das nanopartículas no metabolismo dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

- [1] Organização Mundial da Saúde (OMS). Obesity and overweight – Fact sheet Updated June 2016. [acesso em 2017 Jun 29]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>.
- [2] Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO. 3rd ed. Itapevi: AC Farmacêutica; 2009. Disponível em: http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes_brasileiras_obesidade_2009_2010_1.pdf
- [3] Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and obesity: An Overview. *Viruses*. 2015;7(7):3719-40.
- [4] Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr Obes Rep*. 2015;4(3):363-70.
- [5] González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17034.
- [6] Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(4):387-407.
- [7] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(1):1-16.
- [8] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):129-39.
- [9] Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):218-38.
- [10] Mathis D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab*. 2013;17(6):851-9.
- [11] Freedman DS. Relationship of Changes in Obesity to Serum Lipid and Lipoprotein Changes in Childhood and Adolescence. *JAMA J Am Med Assoc*. 26 de julho de 1985;254(4):515
- [12] Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12490–5.
- [13] Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall’Aglia E, Luchetti L, Buonanno G, et al. Risk Factors for Coronary Artery Disease in Healthy Persons with Hyperinsulinemia and Normal Glucose Tolerance. *N Engl J Med*. 16 de março de 1989;320(11):702–6.
- [14] Carneiro JRI, Kushnir MC, Clemente ELS, Brandão MG, Gomes M de B. Obesidade na adolescência: fator de risco para complicações clínico-metabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. outubro de 2000;44(5):390–6.
- [15] Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. 2013;93(1):359-404.

- [16] Walker GE, Marzullo P, Ricotti R, Bona G, Prodam F. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;19(1):57-74.
- [17] Bras N. RELATÓRIO Relatório Integrado sobre a eficácia e segurança dos inibidores do apetite. 2011;
- [18] Martins ELM, Amaral M da PH do, Ferreira MBC, Mendonça AÉ de, Pereira MCS, Pereira DC, et al. Dispensações de psicotrópicos anorexígenos no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Cien Saude Colet*. dezembro de 2012;17(12):3331–42.
- [19] Kirk SFL, Penney TL, McHugh T-LF, Sharma AM. Effective weight management practice: a review of the lifestyle intervention evidence. *Int J Obes (Lond)*. fevereiro de 2012;36(2):178–85.
- [20] Boaz M, Lisy L, Zandman-Goddard G, Wainstein J. The effect of anti-inflammatory (aspirin and/or statin) therapy on body weight in Type 2 diabetic individuals: EAT, a retrospective study. *Diabet Med*. julho de 2009;26(7):708–13.
- [21] Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 17 de agosto de 2008;60(11):1307–15.
- [22] Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, et al. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology*. 2012;10(1):11.
- [23] Hu Y-L, Gao J-Q. Potential neurotoxicity of nanoparticles. *Int J Pharm*. 15 de julho de 2010;394(1–2):115–21.
- [24] Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América N. Principles of Laboratory Animal Care. 80-23. 1996.
- [25] (Concea) CNDCEA/ MDCTEI. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Vasa. 2016.
- [26] Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res*. janeiro de 1972;13(1):2–11.
- [27] Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol*. novembro de 1997;273(5 Pt 2):R1704-8.
- [28] Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. novembro de 2010;1212:97–113.
- [29] De Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm métabolisme*. março de 2013;45(3):190–6.
- [30] Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT de, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7(1):e30571.
- [31] Wang C-Y, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421–33.

- [32] Sciences AP, Piracicaba UM De, Paulista UE. Animais de laboratório : o camundongo. 2007;(16):11–23.
- [33] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–6.
- [34] Turkevich J, L. Friedman, et al., Determination of position position of tracer atom in a molecule mass spectra of some deuterated hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 2638–2643.
- [35] Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutat Res.* 2013;766–767:25–30.
- [36] Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In Vivo Study of Spherical Gold Nanoparticles: Inflammatory Effects and Distribution in Mice. Kanzaki M, organizador. *PLoS One.* 28 de fevereiro de 2013;8(2):e58208.
- [37] Moretto TL, Benfato ID, Pereira F, Carvalho D, Barthichoto M, Le L, et al. The effects of calorie-matched high-fat diet consumption on spontaneous physical activity and development of obesity. *Life Science.* 2017;
- [38] Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):190-7.
- [39] Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol.* 1986;251(5 Pt 1):E576-83.
- [40] Després JP, Nadeau a, Tremblay a, Ferland M, Moorjani S, Lupien PJ, et al. Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose-tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes.* 1989;38(MARCH):304–9.
- [41] Vasdev S, Longerich L, Gill V. Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem* 2004;37:1-9.
- [42] Muller AP, Ferreira GK, da Silva S, Nesi RT, de Bem Silveira G, Mendes C, et al. Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats. *Mater Sci Eng C.* 2017;77:1145–50.
- [43] Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):753-68.
- [44] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Declining prevalence of no known major risk factors for heart disease and stroke among adults - United States, 1991-2001. *MMWR Morb Mortal. Wkly Rep.* 2004; 53: 4-7.
- [45] Rizos E, Mikhailidis DP. Are high density lipoprotein (HDL) and triglyceride levels relevant in stroke prevention? *Cardiovasc Res.* 2001; 52: 199-207
- [46] Clifton PM, Nestel PJ. Influence of gender, body mass index, and age response of plasma lipids to dietary fat plus cholesterol. *Atheroscler Thromb.* 1992; 12: 955-62

ANEXOS

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISULPalhoça, 09 de novembro de 2016
Registro na CEUA (código): 16.018.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Efeitos da administração de nanopartículas de ouro isoladas ou associadas ao diclofenaco de sódio sobre parâmetros de adiposidade, inflamatórios e bioquímicos em camundongos submetidos a obesidade.”, registrada com o nº16.018.4.01.IV, sob a responsabilidade de Gislaine Tezza Rezin - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 09/11.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão



LIFE SCIENCES

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF

CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.2
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2 • **Guide for Authors** p.4



ISSN: 0024-3205

DESCRIPTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the **molecular, cellular, and functional basis of therapy**. The journal emphasizes the understanding of mechanism that is relevant to all aspects of human disease and translation to patients. All articles are rigorously reviewed.

The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain **molecular, cellular and physiological mechanisms**. Articles that merely report observations are rarely accepted. Recommendations from the Declaration of Helsinki or NIH guidelines for care and use of laboratory animals must be adhered to. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research. The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the **life sciences**. We particularly encourage submission of brief, focused reviews containing highquality artwork and require the use of mechanistic summary diagrams.

Manuscripts should present novel preclinical findings addressing questions of **biological significance** to **human disease**. Studies that fail to do so may be rejected without review. Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods. *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration. The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment. Clinical studies may be considered if they expand understanding of mechanism, but the journal does not encourage clinical trial reports.

Four common reasons for rejection include: out of scope (the manuscript does not conform to the goal of identification of mechanisms related to therapy for human disease); too preliminary (manuscript is based on a limited amount of experimental data diminishing significance); lack of novelty (manuscript is well done but does not address a significant question); unidentified structure (actions of biological extracts of unknown chemical composition).

AUDIENCE

Pharmacologists, microbiologists, toxicologists, neurobiologists, immunologists.

IMPACT FACTOR

2016: 2.936 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Biological and Agricultural Index
 Elsevier BIOBASE
 Current Contents
 MEDLINE®
 EMBASE
 Energy Data Base
 Energy Research Abstracts
 Nutrition Abstracts
 Ophthalmic Literature
 PASCAL/CNRS
 PsycLIT CD-ROM
 Reference Update
 PsycINFO
 Scopus
 EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

L.E. Wold, College of Nursing, Department of Physiology and Cell Biology, DHLRI, The Ohio State University, 473 W. 12th Avenue, Columbus, Ohio, OH 43210, USA

Managing Editor:

C. Kisthardt, Tucson, Arizona, USA

Statistics Editor

L. A. Szalacha, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Associate Editors:

K.D. Beck, Newark, New Jersey, USA
B.J. Biesiadecki, Columbus, Ohio, USA
F. del Monte, Charleston, South Carolina, USA
M. Falvo, East Orange, New Jersey, USA
F. Gao, Xi'an, China
L.H. Rogers, Columbus, Ohio, USA
F. Sheikh, La Jolla, California, USA
M. Velten, PD, Bonn, Germany
A. Zanesco, Rio Claro (SP), Brazil

Ethics Board**East Asia:**

N. Emoto
F. Gao, Fourth Military Medical University, Xi'an, China
R. Liao, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA

Europe:

S. Brain, King's College London, London, England, UK

India:

P.K. Mukherjee, Jadavpur University, Kolkata, India

Middle East & Iran:

M. Abdollahi, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

North America:

S. Teich, Levine Children's Hospital, Charlotte, North Carolina, USA

South America:

C.A.C Pedra, Institute Dante Pazzanese of Cardiology, Sao Paulo, Brazil

Editorial Advisory Board:

E. Antunes, Campinas (SP), Brazil
J.W. Calvert, Atlanta, Georgia, USA
K. Campbell, Lexington, Kentucky, USA
S. Campbell, New Haven, Connecticut, USA
M. Canis, Göttingen, Germany
C. Carnes, Columbus, Ohio, USA
J.C. Chatham, Birmingham, Alabama, USA
Z. Chen, Duarte, California,
 USA **J.T. Cheng**, Tainan,
 Taiwan
B. Colson, Tucson, Arizona, USA
J.M. Daniel, New Orleans, Louisiana, USA
A.J. Davidoff, Biddeford, Maine, USA
G. de Nucci, São Paulo, , Brazil
G. Ertl, Würzburg, Germany
F Ferguson, Phoenix, , Arizona, USA
A.V. Gomes, Davis, California, USA
G. Haddad, Washington, Washington, USA
J. Heller Brown, La Jolla, California,
 USA **R.N. Kitsis**, Bronx, New York,
 USA
R.A. Kloner, Los Angeles, California, USA
S. Lange, La Jolla, California, USA
M. Li, Orangeburg, New York, USA
R. Liao, Boston, Massachusetts, USA
G. Mattace Raso, Napoli NA, Italy
U. Mende, Providence, Rhode Island, USA
L. Nelin, Columbus, Ohio, USA
T.R. Nurkiewicz, Morgantown, West Virginia, USA
N. Paolucci, Bethesda, Maryland, USA

N. Purcell, La Jolla, California, USA
J.R. Richardson, Rootstown, Ohio, USA
M. Robbins, Chicago, Illinois, USA
K. Singh, Johnson City, Tennessee, USA
K. Stanford, Columbus, Ohio, USA
S. Takasawa, Kashihara, Nara, Japan
B. Tanner, Pullman, Washington, USA
T. Tipple, Birmingham, Alabama, USA
N. Weisleder, Columbus, Ohio, USA
C. Wingard, Louisville, , Kentucky, USA
Q. Zhang, Iowa City, Iowa, USA
M. Ziolo, Columbus, Ohio, USA

Editor Emeritus:

Frank Porreca

GUIDE FOR AUTHORS

YOUR PAPER YOUR WAY

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

INTRODUCTION

Life Sciences is an international journal publishing articles that emphasize the molecular, cellular, and functional basis of therapy. All articles are rigorously reviewed. The Journal favors publication of full-length papers where modern scientific technologies are used to explain molecular, cellular and physiological mechanisms. Articles that merely report observations are rarely accepted. Articles should be written at a level accessible to readers who are non-specialists in the topic of the article themselves, but who are interested in the research.

The Journal welcomes reviews on topics of wide interest to investigators in the life sciences. We particularly encourage submission of focused reviews containing high-quality artwork and mechanistic diagrams.

IMPORTANT INFORMATION

- Submission of a paper will be held to imply that the manuscript contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere.
- Manuscripts should present novel findings addressing significant biological questions. Studies that fail to do so may be rejected without review.
- Quantitative conclusions must be based on truly quantitative methods.
- *Life Sciences* does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration.
- The study must be reproducible; materials used must be available to other researchers so they can repeat the experiment.

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Please include word count and figure/table count on the cover page of your manuscript.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of article

- Original research articles
- Reviews

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of Interest Policy

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text, under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state: "The authors declare that there are no conflicts of interest." See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. A signed [Conflict of Interests Policy Form](#) is required upon submission. The corresponding author is responsible for completing the form, and signing it on behalf of all authors.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Authorship

All authors listed on your paper must have made significant contributions to the study. To ensure clarity, you are required upon submission to enter the specific details of each author's contribution, which must substantiate the inclusion of each person on the manuscript. This information is required to be filled in on the [Conflict of Interests Policy and Author Statement Form](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original

submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's page in EES, removing the need for a hard-copy paper trail.

Specific queries can be directed to lifesci@elsevier.com.

Referees

To expedite the review process, authors must submit names of 4 - 6 individuals who are qualified to review their work. Include the email address of each potential referee, as much contact information as possible, and why you feel this person is competent to review your work. You should not have collaborated with the suggested reviewers at any time in the past five years. In our effort to enhance global perspective and communication of science, these individuals should be associated with institutions from as many different regions as possible (Europe, North America, Asia, etc.). Exception: Symposium submissions which have been previously reviewed and approved by their Organizing Committee.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Maximum length 150 characters including spaces. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.

2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.

3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.

4. A structured abstract has to be submitted for full length articles (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:

Aims:

Main methods:

Key findings:

Significance:

5. Three or more key words for indexing purposes. In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

Present the conclusions of the study in a short Conclusions section.

The Graphical Abstract is optional for research articles, but mandatory for reviews. GAs should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Refer to the following website for more information <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts>.

Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text.

Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned.

Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services,

such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/life-sciences>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

- [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

- [2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

- [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

- [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

- [dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the

open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).