



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
KAREN BEATRIZ GESSLER

**AS CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO IMUNE SISTÊMICA SOBRE O SISTEMA
NERVOSO CENTRAL APÓS TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA NO PERÍODO
NEONATAL: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

Palhoça
2020

KAREN BEATRIZ GESSLER

**AS CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO IMUNE SISTÊMICA SOBRE O SISTEMA
NERVOSO CENTRAL APÓS TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA NO PERÍODO
NEONATAL: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde como requisito para a obtenção do
título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Clarissa Martinelli Comim Cassol, Dra.

Palhoça

2020

G47 Gessler, Karen Beatriz, 1987-

As consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após tolerância imunológica no período neonatal : um estudo pré-clínico / Karen Beatriz Gessler. – 2020.
63 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Clarissa Martinelli Comim Cassol

1. Tolerância imunológica. 2. Sistema nervoso central – Doenças - Tratamento. 3. Sistema imune. I. Cassol, Clarissa Martinelli Comim. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.079



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

As consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após
tolerância imunológica no período neonatal:
um estudo pré-clínico

KAREN BEATRIZ GESSLER
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 30 de julho de 2020.

Doutora Clarissa Martinelli Comim Cassol (orientador)

Doutora Daiane de Bittencourt Fraga (Avaliador externo - University of Massachusetts
Amherst) – *presente por videoconferência*

Doutora Eliane Silva de Azevedo Traebert (avaliador interno) – *presente por videoconferência*

Professor Doutor Jefferson Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

• Unisul – Universidade do Sul de Santa Catarina – Sede – Reitoria – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3100
• Campus Universitário de Tubarão – Av. José Acácio Moreira, 787 – Bairro Dehon – CEP: 88704-900 – Tubarão – Santa Catarina – Fone: (48) 3621.3000
• Campus Universitário da Grande Florianópolis – Av. Pedra Branca, 25 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-270 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1000
• Campus Universitário UnisulVirtual – Av. dos Lagos, 41 – Cidade Universitária Pedra Branca – CEP: 88137-100 – Palhoça – Santa Catarina – Fone: (48) 3279.1242

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A minha amada e estimada família que sempre me dá força e estímulos para enfrentar qualquer jornada.

A minha professora e orientadora Prof^a Dr^a Clarissa Martinelli Comim Cassol pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste Mestrado.

Ao Professor Maicon Kwiecinski por toda ajuda e contribuição ao meu trabalho.

Agradeço também ao meu esposo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Quero agradecer também a minha filha, que embora não tivesse conhecimento disto, iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

A todos os meus colegas e professores do Mestrado, que proporcionaram muitos momentos de aprendizagem.

Sem a colaboração de todos, nada disso seria possível, obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho normal”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A ativação imune é caracterizada por um processo inflamatório ocasionado infeccioso por agentes patogênicos e também, por endotoxinas como o lipopolisacarídeo (LPS). Embora, na infância o sistema imune inato ainda esteja em desenvolvimento, possui maior capacidade plástica, pois estímulos externos como patógenos, podem ser capazes de programar respostas imunes até a idade adulta. A investigação do mecanismo de tolerância, como uma consequência à exposição ao LPS em doses baixas no período neonatal, torna-se relevante, pois visa entender se esta primeira ativação imune pode ou não pré-dispor ao desenvolvimento de alterações tardias após uma segunda exposição a endotoxêmicos quando adulto.

Objetivo: Avaliar as consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após tolerância imunológica no período neonatal. **Métodos:** Estudo pré-clínico do tipo experimental. Utilizou-se 156 camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os animais foram acasalados sendo a prole utilizada para este estudo. Os dados coletados foram inseridos em um banco de dados, desenvolvido em meio eletrônico, no software IBM SPSS Statistics 24.0. A análise estatística dos dados paramétricos realizou-se por meio do teste de ANOVA com post-hoc Tukey, e a análise estatística dos dados não paramétricos realizou-se pelos testes de Kruskal-Wallis. **Resultados:** Observou-se que os animais que receberam LPS na fase neonatal não apresentaram déficits de memória e níveis baixos de interleucina (IL)1 β . No grupo que recebeu LPS na fase neonatal e adulta, houve aumento dos equivalentes malondialdeído (MDA) e carbonilação de proteínas de maneira equivalente ao grupo de animais não tratados. **Conclusão:** Verificou-se que os animais que foram submetidos a tolerância imunológica não apresentaram alteração na memória aversiva e de habituação bem como nos níveis de IL-1 β e no dano oxidativo em tecido cerebral após receberam uma dose efetiva de LPS.

Descritores: Tolerância imunológica. Sistema nervoso central. Sistema imunológico.

ABSTRACT

Introduction: Immune activation is characterized by an inflammatory process caused by infectious pathogens, as well endotoxins such as LPS. Although, in childhood, the innate immune system is still developing, it has greater plastic capacity, because external stimuli such as pathogens, may be able to program immune responses until adulthood. The investigation of the tolerance mechanism, as a consequence of exposure to LPS in low doses in the neonatal period, becomes relevant, as it aims to understand whether or not this first immune activation may predispose to the development of late changes after a second exposure to endotoxemic as an adult. **Objective:** Evaluate the consequences of systemic immune activation on the central nervous system after immunological tolerance in the neonatal period. **Methods:** Pre-clinical study of the experimental type. 156 male and female C57BL / 6 mice were used. The animals were mated and the offspring used for this study. The collected data were inserted into a database, developed electronically, using the IBM SPSS Statistics 24.0 software. The statistical analysis of the parametric data was performed using the ANOVA test with post-hoc Tukey, and the statistical analysis of the non-parametric data was performed using the Kruskal-Wallis tests. **Results:** It was observed that the animals that received LPS in the neonatal phase did not present memory deficits and low levels of IL-1b. In the group that received LPS in the neonatal and adult phase, there was an increase in the MDA equivalents and protein carbonylation in an equivalent way to the group of untreated animals. **Conclusion:** It was found that animals that were subjected to immunological tolerance did not show changes in aversive memory and habituation as well as in IL-1 β levels and oxidative damage in brain tissue after receiving an effective dose of LPS.

Keywords: Tolerância imunológica. Sistema nervoso central. Sistema imunológico.

LISTAS

Lista de abreviaturas:

BCA – Ácido bicinchonínico

BHE – Barreira hematoencefálica

CARS – Síndrome compensatória da resposta anti-inflamatória

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CFMV – Conselho federal de medicina veterinária

CLP – Ligação e perfuração cecal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – ciclo- oxigenase

ERO – Espécies reativas ao oxigênio

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LANEX – Laboratório de neurociência experimental

LPS – Lipopolissacarídeo

MDA – Malondialdeído

MIA – Morte indolor assistida

NaOH – hidróxido de sódio

ncRNAs – RNAs não-codificantes

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

PolyIC – do inglês *polyinosinic-polycytidylic*

RRP – Receptores de reconhecimento padrão

SNC – Sistema nervoso central

TCA – Ácido tricloro acético

TLR – Receptor toll-like

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros:

Quadro 1 - Materiais para a execução do estudo.....	21
Quadro 2 - Varáveis de estudo.....	27

Lista de figuras:

Figura 1 – Desenho do Estudo.....	23
-----------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	13
1.1.1 Ativação imune	13
1.1.2 Neuroinflamação	15
1.1.3 Tolerância endotoxêmica	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MÉTODOS	21
3.1 TIPO DE ESTUDO	21
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	21
3.3 ANIMAIS	21
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	22
3.5 ENSAIOS/ TESTES/ TÉCNICAS	23
3.5.1 Exposição à endotoxemia	23
3.5.2 Testes de memória e de aprendizado	24
3.5.2.1 Habituação ao campo aberto	24
3.5.2.2 Esquiva inibitória	24
3.5.3 Avaliações bioquímicas	25
3.5.3.1 Quantificação dos níveis de proteínas	25
3.5.3.2 Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA)	25
3.5.3.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	26
3.5.3.4 Medida do dano oxidativo em proteínas	26
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	27
3.7 PROCEDIMENTO E ANÁLISE DE DADOS	27
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	27
4 ARTIGO CIENTÍFICO	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO	38
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	38

ANEXO B – PRODUÇÕES E TRABALHOS DESENVOLVIDOS	39
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

A ativação imune é caracterizado por um processo inflamatório ocasionado infeccioso por agentes patogênicos, como bactérias (gram-positivas ou gram-negativas), assim como através de endotoxinas (ou mediadores inflamatórios) como o lipopolissacario (LPS)¹. O aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios sistêmicos, devido a ativação imune, podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e levar à ativação microglial e astrocitária no sistema nervoso central (SNC)². A ativação da microglia inicia um processo de neuroinflamação sustentada principalmente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido encefálico³. Esse processo pode ocasionar mudanças em áreas específicas do SNC como córtex e hipocampo associada a alterações nas funções cognitivas como memória e aprendizado⁴. Estudos pré-clínicos têm mostrado que a exposição ao LPS está associado a consequências em longo prazo, como alterações de memória, de aprendizado e perda neuronal em hipocampo, área importante no processamento cognitivo^{5,6}.

Neste contexto, as infecções causadas por bactérias gram-negativas são de alta prevalência durante toda a vida^{7,8}. O LPS é uma endotoxina derivada da parede celular de bactérias gram-negativas após ser fagocitada e degradada pelas células de defesa^{9,10}. É considerada altamente tóxica por induzir a liberação de citocinas e por aumentar a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO). O LPS é um ligante para o receptor do tipo toll-like 4 (TRL-4). Este receptor faz parte do conjunto de receptores de reconhecimento de padrões (RRP) sendo especializado para reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A ativação de TLR-4 forma um heterodímero intracelular – o inflamassoma. Como consequência, há ativação da via de sinalização responsável pela liberação de interleucina (IL)-1 β e o início de um processo inflamatório¹¹.

Estudos têm mostrado que a tolerância à endotoxina é um importante fenômeno, pois há a exposição do organismo a pequenas quantidades de produtos microbianos, induzindo uma resposta inflamatória diminuída e subsequentemente a um segundo desafio onde a resposta é caracterizada pela liberação diminuída de citocinas pró-inflamatórias¹⁰. A tolerância ao LPS representa uma reprogramação seletiva que tem como objetivo principal limitar a ativação imune e consequentemente

a diminuição do processo inflamatório gerado por um estímulo patogênico^{1,12}. Acredita-se que esta primeira exposição possa proteger o organismo contra um desafio posterior ao LPS. Neste sentido, o mecanismo de tolerância é acompanhado por uma redução nos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β ¹³.

Sabe-se que a infância é um período crítico, onde o sistema imune inato ainda está em desenvolvimento. Entretanto, possui maior capacidade plástica, pois estímulos externos como patógenos, podem ser capazes de programar respostas imunes até a idade adulta^{14,15}. Estudos pré-clínicos têm mostrado que uma dose subletal neste período é eficaz em promover um mecanismo de tolerância imunológica a longo prazo e proteger o SNC contra uma eventual inflamação após a ativação imune na vida adulta ocasionada pela exposição a doses letais de LPS^{16,17}.

Neste sentido, a investigação do mecanismo de tolerância, como uma consequência a exposição ao LPS em doses baixas no período neonatal, torna-se relevante pois visa entender se esta primeira ativação imune pode ou não pré-dispor ao desenvolvimento de alterações tardias após uma segunda exposição a endotoxêmicos quando adulto¹⁸. Dessa forma, o papel do sistema imune pode ser a chave para o entendimento das alterações agudas e tardias provocada pela exposição a endotoxinas em um sistema ainda em formação. Sendo assim, estratégias futuras de tratamento podem se concentrar no equilíbrio entre as ações imunes em períodos específicos da vida do indivíduo. Para entender tal relação, formulou-se a seguinte pergunta de pesquisa: Quais as consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após tolerância imunológica no período neonatal: um estudo pré-clínico?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Ativação imune

A resposta imune inata é um mecanismo natural de defesa inicial que compreende mecanismos de barreiras (pele e mucosas), celulares (neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas, célula natural Killer) e fatores humorais

(complemento). Todas as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias como os macrófagos que demonstram grande capacidade fagocítica e as células dendríticas que processam os patógenos e apresentam os antígenos aos

linfócitos T¹⁹. A defesa contra patógenos é baseada, em partes, na expressão de PRRs para estruturas específicas dos microrganismos denominados como PAMPs. Dentre os PRRs encontra-se os TLR. Os TLR são uma família de proteínas transmembrânicas que atuam no sistema imune inato. São expressos na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células epiteliais ou no citoplasma de células de diferentes tecidos. Existem diferentes TLR identificados, dentre eles o TLR-4 que é quem reconhece o LPS bacteriano¹⁷. A administração de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, em animais, está associada a uma resposta inflamatória através do seu reconhecimento pelo sistema imune inato. Este reconhecimento acontece principalmente através dos receptores TLR-4²⁰.

Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo, seja a partir de uma bactéria gram-negativa ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Esta endotoxina pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais²⁰. O LPS é capaz de ativar principalmente a resposta imune inata com a participação do macrófago. Atua também na resposta imune adquirida, referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos com atuação do TLR-4²⁰.

Resumidamente, o TLR-4 possui a habilidade de ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B alerta o sistema imune quanto a presença de patógenos bacterianos, ativando subsequentemente mediadores pró inflamatórios que irão ativar a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a cicloxigenase (COX). Outra função bem descrita do NF- κ B é a estimulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias²⁰.

As citocinas são descritas como pequenas proteínas inflamatórias de sinalização que podem ser secretadas por inúmeras células componentes do sistema imune, como macrófagos, neurtrófilos e outros. Sabe-se que bactérias e vírus são potentes ativadores de citocinas pró-inflamatórias, tais como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-6, que são os principais efetores da resposta imune periférica e os principais mediadores de doenças neurais em resposta à infecção e a inflamação^{21,22}. O equilíbrio existente entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, permite uma resposta imune efetiva e ao mesmo tempo tem a função de proteger o hospedeiro de uma resposta inflamatória excessiva²⁰.

A ativação imune através do LPS induz uma inflamação sistêmica²⁰ através da ativação do sistema imune inato com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como

TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 e outros mediadores inflamatórios, juntamente com os PAMPs, iniciando uma cascata de alterações fisiológicas e comportamentais²⁰. A inflamação sistêmica pode induzir um quadro de neuroinflamação, associado a danos ou disfunções encefálicas, devido a um aumento da permeabilidade BHE. O processo de neuroinflamação pode ocasionar alterações significativas em áreas específicas do SNC como córtex e hipocampo, provocando prejuízos nas funções cognitivas, como memória e aprendizado a longo prazo³. Neste contexto, estudos com animais, em sua maioria, são realizados por indução de LPS em camundongos. A administração sistêmica do LPS vem sendo muito utilizada para a produção de repostas neuroinflamatórias³.

1.1.2 Neuroinflamação

Em condições fisiológicas, o SNC é protegido de patógenos transportados pelo sangue e células imunes por uma BHE física, que consiste em junções apertadas entre as células endoteliais². O SNC é particularmente vulnerável a danos em resposta à inflamação sistêmica. Infiltração induzida por inflamação de células do sistema imunológico e seus mediadores para o cérebro, conduz a profundas alterações estruturais e funcionais²³. Neste contexto, o aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios sistêmicos pode aumentar a permeabilidade da BHE e levar à ativação microglial e astrocitária²⁴. A ativação da microglia inicia um processo de neuroinflamação sustentada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente no tecido encefálico. Esse processo neuroinflamatório pode ocasionar alterações significativas em áreas específicas do SNC como córtex e hipocampo, provocando prejuízos nas funções cognitivas como memória e aprendizado²⁵.

Durante o processo neuroinflamatório, as alterações no SNC podem envolver mecanismos patogênicos e a resposta imune inata do hospedeiro. Os TLR reconhecem os PAMPs presentes na membrana dos organismos gram-negativos²⁶. Esses receptores são capazes de ligar-se a uma variedade de ligantes com diferentes propriedades e origens, e contribuir para a ativação da micróglia. A ativação microglial também foi associada com uma expressão aumentada de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no tecido encefálico após a inflamação sistêmica. Além disso, a ativação microglial também foi associada a um aumento do estresse oxidativo, desencadeando um processo de morte neuronal associado ao comprometimento cognitivo².

O estresse oxidativo é amplamente referido como um desequilíbrio entre a geração de ERO e sua depuração pelo sistema de defesa antioxidante. Supõe-se que durante a ativação imune sistêmica, com a ação das EROs e a ineficiente ação das enzimas antioxidantes, ocorra a permeabilidade da BHE expondo o cérebro a citocinas, quimiocinas, aumento do fluxo de células inflamatórias e seus mediadores, amplificando a lesão cerebral²⁷. Estudos têm abordado o envolvimento das EROs, redução da capacidade antioxidante e o acúmulo de marcadores de estresse oxidativo em modelo experimental de ativação imune induzido por de sepse²⁸. Durante a ativação imune, as defesas antioxidantes estão sobrecarregadas, dando liberdade para as EROs danificarem a célula, contribuindo para a disfunção cerebral²⁹.

A neuroinflamação pode contribuir significativamente para a progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, de Alzheimer, esclerose múltipla, de Huntington e esclerose lateral amiotrófica³⁰. Tanto os neurônios em desenvolvimento como os maduros possuem numerosos receptores de citocinas pró-inflamatórias, o que os torna suscetíveis a danos associados à inflamação³¹. Neste contexto, a inibição da sinalização de TLR-4 pode induzir a regulação negativa de citocinas e isso tem sido atribuído ao fenômeno de tolerância endotoxêmica⁷.

1.1.3 Tolerância endotoxêmica

Tolerância endotoxêmica é definida como uma resposta reduzida ao LPS após um primeiro encontro a endotoxina, no qual protege o organismo contra um desafio posterior letal ao LPS. Esta tolerância é acompanhada por uma redução de TNF- α e outras citocinas em resposta ao LPS, envolvendo a participação de macrófagos e de mediadores da inflamação, tais como glicocorticoides, prostaglandinas e IL-10¹³.

O LPS é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Tem o potencial de ativar a resposta imune inata em um hospedeiro ao se ligar ao receptor TLR-4⁸. Sua estrutura é composta por duas camadas de açúcares e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é considerada a responsável pela maior ação antigênica do LPS¹³. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa¹⁰. O LPS é um potente desencadeante da inflamação mediada por macrófagos. No entanto, a exposição a quantidades sub-letais, induz um estado de tolerância que reprograma a resposta

inflamatória, resultando na redução da produção de citocinas inflamatórias *in vitro* e *in vivo* após a exposição letal ao LPS¹⁸.

A tolerância à endotoxina é um fenômeno em que a exposição a uma dose baixa de endotoxina torna o tecido menos sensível às exposições subsequentes, também chamada de síndrome compensatória da resposta anti-inflamatória (CARS), que descrevem um estado de hiporreatividade caracterizada pela redução da capacidade das células mieloides em responder a estímulos inflamatórios, particularmente aqueles iniciados pelo LPS^{32,33}. O CARS representa a fase de "exaustão" imune, também chamada de "paralisia imune", observada em um subconjunto de pacientes sépticos geralmente após a primeira fase da sepse³⁴. Estudo recente sugere que a tolerância ao LPS também aumenta a expressão de um subconjunto de genes que podem proteger os animais de infecções sistêmicas enquanto estão no estado tolerado. No entanto, uma base molecular para essas mudanças seletivas na expressão gênica inflamatória durante a tolerância ao LPS permaneceu elusiva¹⁸.

Um recente estudo demonstrou que animais expostos a doses letais de LPS que, semanas antes foram expostos a doses sub-letais de LPS, diminuíram significativamente a produção de citocinas inflamatórias, supressão da ativação da microglia e aumento do número de sobrevivência neuronal dopaminérgica na substância negra. Este estudo mostraram que a tolerância imunológica periférica atenuou a neuroinflamação e inibiu a morte neuronal dopaminérgica associada a neuroinflamação²³. Outro estudo também recente, mostrou que a injeção intraperitoneal de LPS em camundongos desencadeou dois tipos de memórias imunes no parênquima cerebral, dependendo da intensidade e duração do estímulo inflamatório. Uma única injeção de LPS em concentrações letais exibiu um aumento de citocinas corticais inflamatórias após um insulto subsequente. Entretanto, a exposição a doses subsequentes em concentrações baixas de LPS durante quatro dias consecutivos induziu um mecanismo de tolerância caracterizado por uma diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias corticais após um segundo insulto com concentrações altas¹⁷.

Em um estudo realizado por Ellis, Mouihate e Pittman que a administração no período neonatal de um ácido viral mimético, o polyinosinic-polycytidylic (PolyIC) em doses baixas, alterou as respostas neuroimunes em adultos frente a um desafio de PolyIC subsequente. Os resultados mostram que os animais tratados no período

neonatal com PolyIC e expostos quando adultos, tiveram respostas febris mais atenuadas e uma melhor resposta neuroimune³⁵. Boissé e colaboradores observaram que a exposição ao LPS em baixas concentrações por 14 dias em filhotes de ratos suprimiu o desenvolvimento de febre em animais adultos associado a uma redução de IL-6 e TNF- α ³⁵. Shanks e associados demonstraram que a exposição a baixas concentrações de LPS no período neonatal foi associado a regulação imune, incluindo o aumento da sensibilidade e especificidade de linfócitos. Também foi eficaz na redução de COX-2 em ratos adultos após exposição de doses letais de LPS³⁶.

Neste contexto, Saia e colaboradores verificaram que a administração de doses subletais de LPS, seguido da submissão ao modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) quando adulto, aumentou a sobrevivência dos animais devido a um aumento no nível de anticorpos anti-LPS IgM específicos e uma redução a resposta de citocinas. O estudo também mostrou que uma única injeção de LPS no período neonatal foi suficiente para proporcionar uma duradoura proteção contra processo inflamatório complexo³⁷.

Monguió-Tortajada e colaboradores relatam que para alcançar a tolerância à endotoxina, é necessária uma reprogramação extensiva, denominada "treinamento imunológico inato", que leva a modificações dos componentes intracelulares da sinalização dos TLR¹⁷. Neste mesma linha de pensamento, Vergadi, Vaporidi e Tsatsanis mostraram que RNAs não-codificantes (ncRNAs) foram reconhecidos como reguladores críticos da sinalização de TLR. Especificamente, microRNAs (miR-146, miR-125b, miR-98, miR-579, miR-132, let-7e e outros) são induzidos na ativação de TLR e promovem reciprocamente tolerância a endotoxina³³.

A infância é um período crítico. O sistema imune inato está imaturo e em desenvolvimento mas, apesar disso, possui um mecanismo de plasticidade eficiente, onde estímulos patogênicos podem reprogramar respostas imunológicas até a idade adulta³⁷. Sun e associados, mostraram que o processo de tolerância ao LPS é mais eficaz em ratos jovens quando comparados aos ratos adultos³⁸. Devido as mudanças ocasionadas no sistema imune e adaptivo devido a idade, a fase adulta apresenta padrões de citocinas diferenciados e há um declínio na função das células apresentadoras de antígenos, nas funções dos macrófagos, nas células *natural killer*, nos linfócitos e na atividade captadora dos receptores^{39,40}.

Neste sentido, torna-se importante a investigação do envolvimento dos mecanismos de tolerância por exposição a baixas concentrações de LPS no período

neonatal com a pré-disposição ou não ao comprometimento do SNC após ativação imune por exposição a dose letal de LPS quando adultos. Dessa forma, estratégias futuras de tratamento podem se concentrar no equilíbrio entre as ações imunes pró e antiinflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após tolerância imunológica no período neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comprometimento da memória e do aprendizado 10 dias após ativação imune em animais adultos submetidos a tolerância imunológica neonatal;
- Avaliar os níveis de IL-1 β em tecido cerebral 24 horas após ativação imune em animais adultos submetidos a tolerância imunológica neonatal;
- Verificar a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas em tecido cerebral 24 horas após ativação imune em animais adultos submetidos a tolerância imunológica neonatal;

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo é caracterizado como sendo pré-clínico do tipo experimental.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Quadro 1 - Materiais para a execução do estudo

Equipamento	Marca	País
LPS (026:B6L E.Coli)	Sigma Aldrich	Brasil
Tampão fosfato- salino (PBS)	Laborclin	Brasil
Pentobarbital (tiopental sódico)	Cristália	Brasil
KIT ELISA	Pensabio	Brasil
TBA	Sigma-Aldrich	EUA

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acasalados (um macho para cada fêmea) e a prole utilizada para este estudo. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, ciclo de claro e escuro de 12 horas (6h às 18h) e comida e água livres. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram acondicionados no Biotério Experimental do Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX) localizado no campus Pedra Branca, no Bloco I2.

O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$, para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%. Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais será utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existam

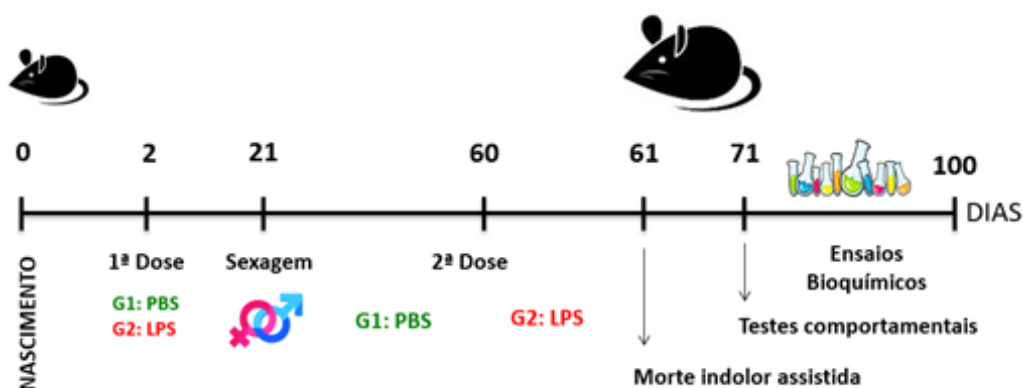
tampouco estar observando diferenças onde elas não existam. Para segurança e confiabilidade dos dados, foi utilizado 10 animais por grupo neste estudo. A mortalidade foi avaliada durante todo o experimento. A literatura relata que este modelo experimental pode haver mortalidade de 60% nos primeiros dias após a exposição endotoxêmica. Assim, foram utilizados 156 animais.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais sendo compostos por 10 animais cada grupo. Os grupos inicialmente foram divididos em dois grupos, em animais que receberam LPS ou PBS aos dois dias de vida e os que receberam LPS ou PBS na idade adulta como segue: Grupo (1) controle: PBS+PBS, grupo (2) controle positivo: PBS+LPS. Grupo (3) controle negativo: LPS+PBS, LPS+LPS grupo (4) de possível tolerância.

Ao completarem dois dias de vida, a prole foi retirada da caixa para a exposição à endotoxemia por LPS (ou PBS para os animais controles). A endotoxemia leve (inicial) foi induzida com uma única administração subcutânea de 0,2 mg/kg de LPS (dose subletal), que foi preparado com o auxílio de PBS para diluição. Os animais controles receberam apenas PBS no mesmo volume administrado no LPS41. A mortalidade foi avaliada durante todo o experimento. Após a indução, os animais retornaram para suas caixas e quando completaram 21 dias de vida foi feita a sexagem e separados por caixas-moradias. Ao completarem 60 dias de vida, receberam novamente uma única dose de LPS 0,5mg/kg (dose letal). Vinte e quatro horas após, parte dos animais foram submetidos a morte indolor assistida (MIA) recebendo injeção de uma dose excessiva de pentobarbital de 80 mg/kg via intraperitoneal de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão de médico veterinário responsável e o encéfalo retirado e armazenado em freezer -80 graus celcius para posterior avaliação bioquímica. Outra parte dos animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação da memória e do aprendizado, 10 dias após a segunda exposição ao LPS42.

Figura 1 – Desenho do Estudo



No segundo dia após o nascimento, os animais receberam a primeira dose de LPS ou PBS. No vigésimo primeiro dia ocorreu a sexagem. Aos sessenta dias de vida os animais receberam a segunda dose de LPS ou PBS. Vinte e quatro horas após a segunda dose, parte dos animais foram mortos para a análise neuroquímica. A segunda parte dos animais foram submetidos aos testes comportamentais após 10 dias da segunda exposição ao LPS ou PBS. tampão fosfato salina (PBS), lipopolissacarídeo (LPS).

3.5 ENSAIOS/ TESTES/ TÉCNICAS

3.5.1 Exposição à endotoxemia

A exposição a endotoxina é baseada em uma primeira dose aos dois dias de vida, caracterizada como sendo subletal por se tratar de uma dose baixa. Os animais receberam uma única injeção subcutânea de LPS na concentração de 0,2 mg/kg com volume de 5 ml/kg de peso corporal (*Escherichia coli* 0111: B4, L-2630; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em PBS. A dose (0,2 mg/kg) de LPS foi baseada em estudos anteriores, nos quais foi demonstrado que o pré-condicionamento de LPS aboliu a inflamação exacerbada e protegeu contra comprometimento cognitivo em modelos animais^{18,43–45}.

Quando adultos (60 dias), os animais receberam a segunda dose de LPS, caracterizada por ser uma exposição letal por se tratar de uma dose alta. Os animais receberam uma única injeção subcutânea de LPS a uma concentração de 0,5 mg/kg

com volume de 5 ml/kg de peso corporal (*Escherichia coli* 0111: B4, L-2630; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em PBS^{16,46}. Os animais do grupo controle receberam uma injeção de PBS com o mesmo regime. A administração do LPS e/ou PBS aconteceu entre as 8:00 e as 9:00 da manhã.

3.5.2 Testes de memória e de aprendizado

3.5.2.1 Habituação ao campo aberto

O teste de memória de habituação ao campo aberto tem por finalidade avaliar a memória do tipo não associativa durante a sessão teste. Para isso foi utilizado o aparato de campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por quatro paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso do aparato de campo aberto é dividido em 16 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos com as 4 patas (crossings: atividade motora) através das linhas pretas e o número de vezes em que os animais se apoiaram sobre as patas traseiras (rearings: atividade exploratória) foram avaliados em ambas as sessões. A diminuição no número de cruzamentos e apoio sobre as duas patas foi considerado como uma medida da retenção de habituação⁴⁷.

3.5.2.2 Esquiva inibitória

A avaliação da memória por esquiva consistiu em duas etapas: treino e teste, realizadas em um intervalo de 24 horas para avaliar memória aversiva de longa duração. A avaliação foi realizada pelos mesmos pesquisadores utilizando-se de equipamento específico para tal avaliação: caixa de esquiva passiva. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma foi cronometrado. Esse período de tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as quatro patas), o animal recebeu um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na sessão

de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém sem administração de choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória⁴⁸.

3.5.3 Avaliações bioquímicas

3.5.3.1 Quantificação dos níveis de proteínas

As proteínas foram mensuradas utilizando o método BCA e albumina bovina como padrão. O ensaio proteico BCA é um método livre de detergentes baseado no ácido bicinchonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação total de proteínas. Este método combina a redução dos catiões cobre (II) a cobre (I) pelas proteínas em meio alcalino (o método do biureto) com a detecção colorimétrica selectiva e sensível dos catiões cobre através da reacção destes com do ácido bicinchonínico. O produto da reacção, de cor púrpura, é formado pela quelatação de um catião cobre por parte de duas moléculas de ácido. O complexo solúvel em água exhibe uma absorvância forte a 562 nm que é praticamente linear com o aumento da concentração de proteína dentro de um intervalo relativamente largo (20-2000 µg / mL)⁴⁹.

3.5.3.2 Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA)

As amostras biológicas foram retiradas e as concentrações de citocinas foram avaliadas pelo método de ELISA. As amostras de tecido encefálico foram homogeneizadas com PBS contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de 100 fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml), cloreto de benzetônio (0,1 mM). O homogenato foi transferido para tubos Eppendorf, centrifugados a 3000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi estocado a -80°C para posterior análises. Um volume de 100 µl da amostra foi utilizado para mensurar a concentração dos níveis de IL-1β. Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido à 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placas de ELISA. Assim todos os resultados foram expressos em picogramas de citocinas⁵⁰.

3.5.3.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método foi utilizado para avaliação do estado de oxidação de hidroperóxidos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana foi determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (como MDA ou malondialdeído), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um produto colorido róseo, lido em leitor de microplacas a 535nm. A técnica consiste na seguinte forma: primeiramente, foi calculado o valor da diluição para que, no tubo de reação do TBARS, tenha 100µl de proteína do tecido em 500µl de tampão BHT. Em seguida, adicionado 500µl da solução de TBA a 0,67%. Os tubos foram colocados em banho seco à 96°C, durante 30 minutos. Para parar a reação, as amostras foram colocadas em gelo durante 5 minutos. Por fim, 200 µl da reação foram colocados em microplacas de 96 poços e lidos no leitor de microplacas à 535nm^{51,52}.

3.5.3.4 Medida do dano oxidativo em proteínas

Este método foi utilizado para dosagem de oxidação de proteínas. Baseia-se no princípio de que vários ERO atacam resíduos de proteínas como aminoácidos para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual poderá ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de proteína carboniladas é determinado através de um leitor de microplacas a 370nm, como descrito por Levine e colaboradores, em 1990. Primeiramente, o tecido foi homogeneizado em 1 ml de tampão BHT. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos à 4°C em 14000 rpm. Foram separados 200 µl da amostra para o branco e 200 µl para o teste e ainda, colocados 100 µl de ácido tricloro acético (TCA) a 20% em todos os eppendorfs. Foi centrifugado por 5 minutos em 14000 rpm. Foi descartado o sobrenadante e foi redissolvida o pellet em 100 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 molar. Foram colocados 100 µl de dinitrofenilhidrazina 2,4 (DNTP) na amostra e deixado descansar por 1 hora. E ainda, foram colocados 100 µl de TCA a 20% em todos os eppendorfs, que foram centrifugados por 3 minutos. Também será descartado o sobrenadante. O pellet foi lavado por 3 vezes com 500 µl de etanol e acetato de etila (1:1). Para cada lavagem, foi centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm e descartado o sobrenadante.

Depois de descartar a última lavagem, foi colocado 1ml de NaOH 3% em todos os eppendorfs. Por último, as amostras foram levadas ao banho-maria à 60°C por 30 minutos e lidas no leitor de microplacas a 370 nm⁵³.

3.6 VARIÁVIES DE ESTUDO

Quadro 2 - Varáveis de estudo

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Endotoxemia	Independente	Quantitativa nominal dicotômica	Sim ou Não
Memória aversiva	Dependente	Quantitativa Discreta	Número de cruzamentos
Esquiva Inibitoria	Dependente	Quantitativa Continua	Tempo em segundos
IL-1 β	Dependente	Quantitativa Continua	pg/ml
Peroxidação lipídica	Dependente	Quantitativa Continua	pg/ml
Carbonilação de proteínas	Dependente	Quantitativa Continua	pg/ml

3.7 PROCEDIMENTO E ANALISE DE DADOS

Após a coleta, os dados foram inseridos em um banco de dados, desenvolvido em meio eletrônico, no software IBM SPSS *Statistics 24.0* (@copyright IBM corporations and its licensors 1989, 2016). Foi realizado um teste de normalidade de Shapiro-Wilk para caracterização dos dados. Os dados paramétricos foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão da média. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio do teste de ANOVA com post-hoc Tukey. A análise intergrupos foi analisada através do teste t de student para amostras pareadas. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais

(CEUA) da UNISUL seguindo os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (do inglês Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NIH) e aprovado sob o protocolo 19.018.4.01.IV. A experimentação foi realizada de acordo com os aspectos éticos da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (2016), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esta diretriz, assim como a legislação brasileira, estabelece a responsabilidade primária e garante a adesão aos princípios de substituição, redução e refinamento.

Em consonância à DBCA, foram adotados os procedimentos que visam evitar, terminar, minimizar ou reduzir a dor, desconforto ou distresse do animal, utilizando assim ações como: i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse; ii) interrupção de um procedimento doloroso; iii) exclusão do animal do estudo; ou iv) morte humanitária do animal realizado por médico veterinário responsável.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

**CONSEQUENCES OF SYSTEMIC IMMUNE ACTIVATION ON THE
CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFTER IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN THE
NEONATAL PERIOD: A PRE-CLINICAL STUDY**

Submetido a revista Neuroscience Letters

Fator de impacto: 2.274

CONSEQUENCES OF SYSTEMIC IMMUNE ACTIVATION ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFTER IMMUNOLOGICAL TOLERANCE IN THE NEONATAL PERIOD: A PRE-CLINICAL STUDY

Karen B. Gessler^a, Leticia Ventura^a, Viviane Freiburger^a, Paula Dias^a,
Clarissa M. Comim^a

^aResearch group in neurodevelopment of childhood and adolescence, Laboratory of Experimental Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina. Avenida Pedra Branca, 25, Pedra Branca, 88137-270 Palhoça, SC, Brazil

***Corresponding author:**

Clarissa M. Comim, Ph.D. Research Group of Experimental Neuropathology, Laboratory of Experimental Neuroscience. Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, CEP 88137-270, Palhoça, Palhoça, SC, Brazil. E-mail: clarissamc@gmail.com phone: +55 48 3621-3363

ABSTRACT

Introduction: Immune activation is characterized by an inflammatory process caused by infectious pathogens, such as bacteria, as well as through endotoxins such as LPS. Although, in childhood, the innate immune system is still developing, it has greater plastic capacity, because external stimuli such as pathogens, may be able to program immune responses until adulthood. The investigation of the tolerance mechanism, as a consequence of exposure to LPS in low doses in the neonatal period, becomes relevant, as it aims to understand whether or not this first immune activation may predispose to the development of late changes after a second exposure to endotoxemia as an adult. Objective: Evaluate the consequences of systemic immune activation on the central nervous system after immunological tolerance in the neonatal period. Methods: Pre-clinical study of the experimental type. To this aim, male and female C57BL/6 mice were used. The animals were mated and the offspring used for

this study. When mice aging two days received a low single injection of subcutaneous lipopolysaccharide (LPS). After 58 days, the same animals received a high single injection of subcutaneous LPS. At 61 days old, habituation, aversive and object recognition memory were evaluated and the hippocampus, prefrontal cortex, striatum, cerebellum and total cortex were dissected to evaluate the IL-1 β levels and MDA equivalents and protein carbonylation. Results: It was observed that the animals in the PBS + PBS and LPS + PBS groups did not show memory deficits. However, the PBS + LPS animals showed habituation and aversive memory impairment. The results of IL-1 β showed that there was an increase in IL-1 β levels in all structures evaluated in the PBS + LPS group. It was also observed that in the LPS + LPS group there was an increase in the MDA equivalents and protein carbonylation in all evaluated structures when compared to the PBS + PBS group of animals. In the LPS + LPS group there was a decrease in these levels in the prefrontal cortex, cerebellum, hippocampus and striatum when compared to the PBS + LPS group. Conclusion: The study showed how important it is to understand tolerance and to plan therapeutic strategies for many diseases based on CNS inflammation, as well as the use of a technique that has been improved for years as early immunization therapy as in the case of neonatal immune activation.

Keywords: Immune tolerance, central nervous system, immune system.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo, verificou-se que os animais que foram submetidos a tolerância imunológica não apresentaram alteração na memória aversiva e de habituação bem como nos níveis de IL-1 β e no dano oxidativo em tecido cerebral após receberam uma dose efetiva de LPS. Entender as consequências da ativação imune sistêmica sobre o sistema nervoso central após tolerância imunológica no período neonatal poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças e transtornos relacionadas a neuroinflamação, trazendo avanços na área da ativação imune e seus efeitos a longo prazo e de que forma poderíamos driblar esse desfecho.

Como limitações do estudo, a avaliação de outros marcadores inflamatórios e da atividade antioxidante não foi realizada devido ao distanciamento do laboratório de pesquisa decorrente a pandemia de COVID-19. Estes resultados adicionais podem ajudar a fortalecer os achados encontrados inicialmente neste estudo.

Como perspectivas futuras, estudos adicionais devem ser realizados a fim de relacionar mais diretamente os achados comportamentais e neuroquímicos iniciais aos mecanismos e vias moleculares envolvidos na tolerância imunológica.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):82.
2. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(4):192–208.
3. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015; 2:9–28.
4. Gemma C. Neuroimmunomodulation and Aging. *Aging Dis*. 2010; 1(3):169–72.
5. Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, Coogan AN. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*. 2015; 1(43):98–109.
6. Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser M-B, Moser EI. Navigating from hippocampus to parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):14755–62.
7. Claypoole LD, Zimmerberg B, Williamson LL. Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait. *Brain Behav Immun*. 2017; 59:135–46.
8. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8514–9.
9. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167–202.
10. Li P, Li M, He K, Zhong K, Gong J, You H. The effects of Twist-2 on liver endotoxin tolerance induced by a low dose of lipopolysaccharide. *Inflammation*. 2014 Feb;37(1):55–64.
11. Xiong J, Miller VM, Hunter LW, Li Y, Jayachandran M. Leukocyte- and platelet-derived microvesicle interactions following in vitro and in vivo activation of toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide. Kaushal D, editor. *PLoS One*. 2011;6(9):e25504–e25504.
12. Ariga SK, Abatepaulo FB, Melo ESA, Velasco IT, Pinheiro da Silva F, de Lima TM, et al. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. *Shock*. 2014;42(2):168–73.

13. Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10(5):233.
14. Benatti C, Alboni S, Capone G, Corsini D, Caggia F, Brunello N, et al. Early neonatal inflammation affects adult pain reactivity and anxiety related traits in mice: genetic background counts. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(7):661–8.
15. Amani M, Samadi H, Doosti M-H, Azarfarin M, Bakhtiari A, Majidi-Zolbanin N, et al. Neonatal NMDA receptor blockade alters anxiety- and depression-related behaviors in a sex-dependent manner in mice. *Neuropharmacology*. 2013;73:87–97.
16. Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*. 2017; 101(1):107–19.
17. Monguió-Tortajada M, Franquesa M, Sarrias M-R, Borràs FE. Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes. *Cell Death Dis*. 2018; 9(5):499.
18. Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*. 2017;101(1):107–19.
19. Lykhmus O, Mishra N, Koval L, Kalashnyk O, Gergalova G, Uspenska K, et al. Molecular Mechanisms Regulating LPS-Induced Inflammation in the Brain. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:19.
20. Weizman R, Laor N, Karp L, Dagan E, Reiss A, Dar DE, Wolmer L GM. Alteration of platelet benzodiazepine receptors by stress of war. *Am J Psychiatry*. 1994;15:766-7.
21. Dantzer R, Wollman EE. Relationships between the brain and the immune system. *J Soc Biol*. 2003;197(2):81-8.
22. Mansur RB, Zugman A, Asevedo Ede M, da Cunha GR, Bressan RA B, E. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2012;66:247-60.
23. Liu Y, Xie X, Xia L-P, Lv H, Lou F, Ren Y, et al. Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):223.
24. Comim CM, Bussmann RM, Simão SR, Ventura L, Freiburger V, Patrício JJ, et al. Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(9):5928–34.
25. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol*. 2007; 204(2):733–40.
26. Chen W-W, Zhang X, Huang W-J. Role of neuroinflammation in

- neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3391–6.
27. Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med*. 2011;37(4):711–8.
 28. Berg RMG, Møller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(7):1532–44.
 29. Galley HF. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care*. 2010;14(4):230.
 30. Lamar CD, Hurley RA, Taber KH. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. Hurley RA, Hayman LA, Taber KH, editors. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2011;23(3):237–41.
 31. Jin C, Londono I, Mallard C, Lodygensky GA. New means to assess neonatal inflammatory brain injury. *J Neuroinflammation*. 2015; 25(12):180.
 32. Kim ML, Maloney C, Klimova N, Gurzenda E, Lin X, Arita Y, et al. Repeated lipopolysaccharide exposure leads to placental endotoxin tolerance. *Am J Reprod Immunol*. 2019;81(2):e13080–e13080.
 33. Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of endotoxin tolerance and compensatory anti-inflammatory response syndrome by non-coding RNAs. *Front Immunol*. 2018;9:2705.
 34. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med*. 2008; 29(4):617–25.
 35. Boisse L, Mouihate A, Ellis S, Pittman QJ. Long-Term Alterations in Neuroimmune Responses after Neonatal Exposure to Lipopolysaccharide. *J Neurosci*. 2004; 24(21):4928–34.
 36. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, et al. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(10):5645–50.
 37. Saia RS, Oliveira-Pelegrin GR, da Silva MENB, Aguila FA, Antunes-Rodrigues J, Rocha MJA, et al. Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. *Regul Pept*. 2011;169(1–3):21–30.
 38. Sun Y, Li H, Yang M-F, Shu W, Sun M-J, Xu Y. Effects of Aging on Endotoxin Tolerance Induced by Lipopolysaccharides Derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. Heimesaat MM, editor. *PLoS One*. 2012;7(6):e39224.
 39. Grubeck-Loebenstien B, Wick G. The aging of the immune system. *Adv Immunol*. 2002;80:243–84.

40. Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R. Leukocyte function in the aging immune system. *J Leukoc Biol.* 2010;87(6):1001–9.
41. Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* 2017;101(1):107–19.
42. Silswal N, Reis J, Qureshi AA, Papasian C, Qureshi N. Of Mice and Men: Proteasome's Role in LPS-Induced Inflammation and Tolerance. *Shock.* 2017;47(4):445–54.
43. Stevens SL, Leung PY, Vartanian KB, Gopalan B, Yang T, Simon RP, et al. Multiple Preconditioning Paradigms Converge on Interferon Regulatory Factor-Dependent Signaling to Promote Tolerance to Ischemic Brain Injury. *J Neurosci.* 2011;31(23):8456–63.
44. Turner RC, Naser ZJ, Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Vangilder RL, Matsumoto RR, et al. Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells. *Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2017; 4(1):6.
45. Zhang Z, Ji M, Liao Y, Yang J, Gao J. Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharide preconditioning protects against surgery-induced cognitive impairment in aging mice. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):3845–52.
46. Weiland TJ, Anthony-Harvey-Beavis D, Voudouris NJ, Kent S. Metabotropic glutamate receptors mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 2006;20(3):233–45.
47. Bitencourt LTG. Estudos das alterações do comportamento e da resposta psicofarmacológica em ratos sobreviventes de sepse. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.64, 2008.
48. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68(3):285–316.
49. Neves JA, Neves JA, Oliveira R de CM. Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. *J Vasc Bras.* 2016;15(3):224–33.
50. Jang JS, Lee Y, Kandahar HK, Shrestha SK, Lee JS, Lee J, et al. Alterações no nível de TNF- α após bloqueio do nervo femoral guiado por ultrassom em idosos com fratura de quadril. *Brazilian J Anesthesiol.* 2018;68(6):558–63.
51. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
52. De Souza TC, De Medeiros C, Acordi L, Tiago S, Silveira C, Silveira PC, Aurino C, et al. Serum measurement of muscle and oxidative damage in soccer players after a game. *Artig Orig Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.* 2010;12(4):269–74.
53. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al.

Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464–78.

ANEXO

ANEXO A – Parecer de aprovação do comite de ética



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 08 de julho de 2019
Registro na CEUA (código): 19.018.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Comim Cassol

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Consequências da exposição ao LPS na idade adulta após ativação imune neonatal sobre o sistema nervoso central: um estudo pré-clínico", registrada com o 19.018.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Comim Cassol- 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 08 de julho de 2019.

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 Sgrotti
Coordenador da Comissão

ANEXO B – Produções e trabalhos desenvolvidos

1. **Participação e apresentação de trabalho:** International Sepsis Forum: Sepsis 2019. Rio de Janeiro –Maio de 2019. Trabalho intitulado: “Endotoxemia neonatal aumenta o risco de um comportamento relacionado a esquizofrenia em camundongos adultos”.
2. **Participação :** XLII Reunião Anual da SBNeC – Campos do Jordão- Outubro de 2019
3. **Participação e apresentação de trabalho:** I Evento Científico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Unisul: Comemoração dos 10 anos- Tubarão- Novembro de 2019. Trabalho intitulado: “ Ativação imune aumenta o risco de comportamento esquizofrênico em camundongos adultos”.
4. **Artigo (sumetido)** – Paula Dias: “Effects of an enriched environment on cognitive function after neonatal immune activation”
5. **Artigo da dissertação de mestrado:** “Consequences of systemic immune activation on the central nervous system after immunological tolerance in the neonatal period: a pre-clinical study”

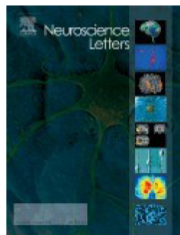


NEUROSCIENCE LETTERS
The rapid communication journal for the neurosciences.

AUTHOR INFORMATION PACK

6 TABLE OF CONTENTS XXX

•	Description	p.1		
•	Audience	p.1		
•	Impact Factor	p.1		
•	Abstracting and Indexing		p.1	
•	Editorial Board	p.2 •	Guide for Authors	p.3



ISSN: 0304-3940

7 DESCRIPTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Only papers which will make a significant addition to the literature in the field will be published. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral and cognitive, as well as computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged. Special Issues, edited by Guest Editors to cover new and rapidly-moving areas, will include invited mini-reviews. Occasional mini-reviews in especially timely areas will be considered for publication, without invitation, outside of Special Issues; these unsolicited mini-reviews can be submitted without invitation but must be of very high quality. Clinical studies will also be published if they provide new information about organization or actions of the nervous system, or provide new insights into the neurobiology of disease. NSL does not publish case reports.

8 AUDIENCE

Neuroscientists, neurologists

9 IMPACT FACTOR

2019: 2.274 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

10 ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS Citation Index
 Chemical Abstracts
 Current Contents - Life Sciences
 Embase
 PubMed/Medline
 Pascal Francis
 Reference Update
 Science Citation Index
 Elsevier BIOBASE
 Scopus

11 EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Stephen G. Waxman, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States

Deputy Editors

Ausim Azizi, Temple University Hospital, Philadelphia, Pennsylvania, United States

Pamela Knapp, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, United States

Associate Editors

David Baglietto-Vargas, University of California Irvine Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, Irvine, California, United States

Susanne Becker, University of Zurich, Department of Chiropractic Medicine, Zurich, Switzerland

Joel Black, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States

- Tobias Bonhoeffer**, Max-Planck-Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany
- Gabriella Bottini**, University of Pavia, Pavia, Italy
- William BJ Cafferty**, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States
- Dongming Cai**, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, United States
- Theodore Cummins**, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, United States
- C. Dalton**, Sheffield Hallam University, Sheffield, United Kingdom
- R.D. Fields**, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD, United States
- Karl J. Friston**, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, United Kingdom
- Andrew Fuglevand**, University of Arizona, Tucson, Arizona, United States
- Fred Gage**, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, United States
- Paul Geha**, University of Rochester, Rochester, New York, United States
- Sten Grillner**, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- Anthony Hannan**, The University of Melbourne Department of Obstetrics and Gynaecology, Parkville, Victoria, Australia
- John Hardy**, University College London, London, United Kingdom
- Michael Harte**, The University of Manchester, Manchester, United Kingdom
- Yasuhiko Ibata**, Kyoto Prefecture, Kyoto, Japan
- Sergio D. Iñiguez**, The University of Texas at El Paso, Department of Psychology, El Paso, Texas, United States
- Habibeh Khoshbouei**, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, United States
- Jeffery Kocsis**, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States
- Weichun Lin**, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, Dallas, Texas, United States
- Z. Liu**, Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of

Sciences, Shanghai, China

David Lyon, University of California Irvine School of Medicine, Irvine, California, United States

Emiliano Macaluso, Santa Lucia Foundation Institute for Hospitalization and Care Scientific, Roma, Italy

Pierre Magistretti, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

Robert Malenka, Stanford Neurosciences Institute, Stanford, California, United States

Mirko Manchia, University of Cagliari Department of Public Health Clinical and Molecular Medicine, Cagliari, Italy

David Matuskey, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States

P. McHugh, University of Huddersfield, Huddersfield, United Kingdom

Akiko Nishiyama, University of Connecticut, Farmington, Connecticut, United States

Haakon Nygaard, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Juan Pascual, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, Dallas, Texas, United States

Christopher Pittenger, Yale University, New Haven, Connecticut, United States

K. Sathian, PENN STATE MILTON S HERSHEY MEDICAL CENTER, Hershey, United States

Petra Schweinhardt, McGill University, Montréal, Quebec, Canada

David Self, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, Dallas, Texas, United States

Wolf Singer, Max-Planck-Institute for Brain Research, Frankfurt am Main, Germany

Grace Stutzmann, Rosalind Franklin University of Medicine and Science Chicago Medical School, North Chicago, Illinois, United States

Eva Sykova, Czech Academy of Sciences, Praha, Czech Republic

Elizabeth Tunbridge, Warneford Hospital, Oxford, United Kingdom

Jana Veliskova, New York Medical College, Valhalla, New York, United States

States

Zheng Wang, Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

Daniel Weinberger, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States

J. Wood, University College London, London, United Kingdom

Hongbo Yu, Fudan University, Shanghai, China

Chun-Li Zhang, UNIVERSITY OF TEXAS SOUTHWESTERN MEDICAL CENTER, Dallas, Texas, United States

Jing Zhao, University College London, London, United Kingdom

Huda Zoghbi, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States

12 GUIDE FOR AUTHORS

12.1 INTRODUCTION

Neuroscience Letters is devoted to the rapid publication of short, high-quality papers of interest to the broad community of neuroscientists. Papers in all areas of neuroscience - molecular, cellular, developmental, systems, behavioral, cognitive, and computational - will be considered for publication. Submission of laboratory investigations that shed light on disease mechanisms is encouraged.

Special Issues, edited by Guest editors to cover new and rapidly-moving areas, will include invited mini-reviews. Occasional mini-reviews in especially timely areas will be considered for publication, without invitation,, outside of Special Issues; these un-solicited mini-reviews can be submitted without invitation but must be of very high quality. In addition, please note: Clinical research will not be considered, unless the study includes new experimental findings of interest to neuroscientists in general. Clinical studies will not be considered unless they teach a lesson about organization or function of the nervous system. Research on natural products, alternative medicine (acupuncture, etc.) and "traditional medicine" are not appropriate for *Neuroscience Letters* and will not be considered. Research that provides descriptive data but without a mechanistic link which is tested rigorously with experimental data, will not be considered. Research using only cell lines, for example PC12 cells, will not be considered.

12.1.1 Types of Article

Neuroscience Letters will publish only the following article type:

Research Article: A report of original research which assesses the contribution of the research outcomes to the body of knowledge in a given area.

Mini-Reviews: NSL welcomes mini-reviews (usually 10 pages or less within the journal) that cover an important topic in neuroscience in a way that will inform readers, including readers not familiar with the topic. Mini-reviews are meant to be short, punchy, and interesting. Given the constraints on length of articles in NSL, they do not have to be comprehensive or encyclopedic, but they do need to present a topic in a way that accurately reflects the literature and is balanced, interesting and credible.

Please explain specialized terms and concepts in a way that will make them clear to workers in other areas of neuroscience.

Please include figures and diagrams to illustrate representative results (representative figures from prior publications can be included WITH PERMISSION). Use pastels for diagrams.

The title should always begin with "Mini-review:" so that the title reads "Mini-review: ____author's title____"

Length of manuscripts should be no more than 5000 words (approximately 6 printed pages). As an approximate guide to authors for judging the length of their paper, the following estimation may be used: heading + abstract = 0.5-0.6 pages; 3 type-written (double-spaced) pages = 1 printed page; (when using a word-processor) 850 words or 5300 characters = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 double-column wide figures plus legends = 1 printed page; 3 single-column wide or 2 doublecolumn wide tables = 1 printed page; 17 references = 0.5 printed page.

Authors of invited Special Issue review articles may exceed the 5000 word limit if required, although please check with the issue's Guest Editor(s) prior to submission.

12.1.2 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.

12.2 BEFORE YOU BEGIN

12.2.1 Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

12.2.2 Studies in humans and animals

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. The manuscript should be in line with the Recommendations for the

Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

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. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans*

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments*

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

For other policy issues, authors are referred to the policy guidelines of the Society for Neuroscience (see their website <http://www.jneurosci.org/misc/itoa.shtml>).

12.2.3 Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state

this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2 . Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

12.2.4 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, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' 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 Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

12.2.5 Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they

are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

12.2.6 Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

12.2.7 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.

12.2.8 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 gold 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 gold 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.

12.2.9 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.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/nsi/>

For submission queries, please contact the Editorial Office
(NSL@elsevier.com).

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses for 8-10 potential referees that meet the following criteria: potential referees must be experts or active workers in the field, must not be current or prior mentors or collaborators, and must have institutional email addresses (e.g., xx.yy@zz.edu) and not generic email addresses (e.g., xx.yy@163.com or xx.yy@gmail.com). Although the journal does not guarantee these reviewers will be used, the Editors take these suggestions under consideration. These recommendations help the journal speed the editorial process.

12.3 PREPARATION

12.3.1 Peer review

This journal operates a single 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.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor

used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier) . Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. 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.

12.3.2 Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply " the text" .

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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is in very occasional cases appropriate, although in general, Results and Discussion should be presented as

distinct sections of the manuscript. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

12.3.3 Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

12.3.4 Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

12.3.5 Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the

purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

12.3.6 Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

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.).

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.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

12.3.7 Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. 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.

12.3.8 Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and

place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

12.3.9 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.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

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.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

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. Using citation 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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

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/neuroscience-letters>

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

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 . [https://doi.org/ 10.1016/j.Sc.2010.00372](https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372).

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19 , e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

[4] 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:

- [5] 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] [6] 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>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations.

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. 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.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

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. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. 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 600 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.

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.

12.4 AFTER ACCEPTANCE

12.4.1 Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. 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.

12.4.2 Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

12.5 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.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>