

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DANIELA MELO MARQUES

**ANÁLISE NEUROQUÍMICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS CORTICAIS DO  
MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE**

Porto Alegre

2016

DANIELA MELO MARQUES

**ANÁLISE NEUROQUÍMICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS CORTICAIS DO  
MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Porto Alegre

2016

Marques, Daniela Melo

Análise neuroquímica de culturas de neurônios corticais do modelo murino do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade / Daniela Melo Marques. -- 2016.

53 f.

Orientadora: Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. TDAH. 2. Ratos espontaneamente hipertensos. 3. Cultura de células. I. Porciúncula, Lisiane de Oliveira, orient. II. Título.

DANIELA MELO MARQUES

**ANÁLISE NEUROQUÍMICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS CORTICAIS DO  
MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fábio Klamt - UFRGS

---

Dr. Leo Anderson Meira Martins - UFRGS

---

Prof. Dr. Lisiane de Oliveira Porciúncula - UFRGS (orientadora)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imunoconteúdo da sinaptofisina, da SNAP-25, do CREB e do pro-BDNF de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no primeiro dia <i>in vitro</i> (1DIV).....	23
Figura 2 – . Imunoconteúdo da sinaptofisina, da SNAP-25, do CREB e do pro-BDNF de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no segundo dia <i>in vitro</i> (2DIV).....	24
Figura 3 – . Imunoconteúdo da sinaptofisina, da SNAP-25, do CREB e do pro-BDNF de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no quinto dia <i>in vitro</i> (5DIV).....	25
Figura 4 – Análise morfométrica dos neurônios marcados com o anticorpo anti-MAP-2 para análise da região somatodendrítica.....	27
Figura 5 – Painel representativo dos neurônios marcados com o anticorpo anti-MAP-2 para análise da região somatodendrítica e com DAPI para marcação dos núcleos.....	28
Figura 6 – Painel representativo dos neurônios marcados com o anticorpo Fluoropan (em verde) para análise da morfologia.....	29

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....</b>	<b>8</b>
1.1 O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).....	8
1.1.1 Etiologia do TDAH.....	8
1.1.2 Sintomas e comorbidades.....	9
1.1.3 Diagnóstico e tratamento.....	10
1.1.4 Genética.....	10
1.1.5 Modelo Animal.....	11
1.2 JUSTIFICATIVA.....	13
1.3 OBJETIVOS.....	14
<b>1.3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROBIOLOGY OF DISEASE.....</b>	<b>41</b>

## RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns da infância, e é caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Atualmente, cerca de 5% da população infantil e 2,5% dos adultos no mundo todo são diagnosticados com TDAH. O TDAH é uma desordem neurocomportamental heterogênea e fenotipicamente complexa, e de causa ainda desconhecida. Como há muitas evidências que apontam para uma disfunção dopaminérgica, o uso de estimulantes como metilfenidato é o tratamento de primeira linha para tratar os sintomas do TDAH. Esse transtorno apresenta polimorfismos no transportador de dopamina (DAT) e no receptor D4 (DRD4), além de polimorfismos nos genes que codificam a proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma (SNAP-25) e a sinaptofisina. A redução na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e o aumento da sinalização da proteína de ligação ao AMPc (CREB) também podem desempenhar um papel na patogenia do TDAH. A cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) é um dos modelos animais mais validados para estudar o TDAH. Esses animais manifestam a hipertensão na vida adulta, no entanto, antes desse período, eles apresentam as principais características do transtorno de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Com base nas alterações genéticas e proteicas encontradas no transtorno, torna-se importante verificar o impacto dessas modificações a nível neuronal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o padrão de desenvolvimento neuronal utilizando a cepa de ratos SHR. Foi realizada uma cultura primária de neurônios corticais a partir de embriões de ratos SHR comparados ao seu controle Wistar-Kyoto. Através da técnica *Western blot* foram identificados o imunoconteúdo de determinadas proteínas, e através da imunocitoquímica foi realizada uma comparação morfométrica do desenvolvimento dos neurônios das linhagens primárias ao longo de diferentes dias *in vitro*. No primeiro dia *in vitro* verificou-se um aumento do imunoconteúdo da sinaptofisina no SHR quando comparado ao seu controle. Já o imunoconteúdo do CREB foi menor no SHR. No segundo dia *in vitro* o imunoconteúdo da SNAP-25 aumentou nos neurônios da linhagem SHR. No quinto dia *in vitro* o imunoconteúdo da sinaptofisina foi maior na SHR, enquanto que o imunoconteúdo da SNAP-25 e do pro-BDNF foram menores na SHR. Com relação aos parâmetros morfométricos, a linhagem SHR apresentou uma redução no comprimento total nos dias *in vitro* 2, 5 e 8. Na análise do número de raízes, houve redução deste parâmetro na linhagem SHR nos dias *in vitro* 2 e 8. Não houve diferença significativa entre as linhagens no número de raízes e no número de pontos de

ramificação em nenhum dos dias *in vitro* analisados. Esses resultados corroboram com estudos anteriores no que diz respeito a alterações de proteínas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência neuronal em um dos modelos animais mais validado para estudar o TDAH. O estudo morfométrico realizado fornece novas perspectivas para a compreensão de diferenças no desenvolvimento verificadas nos neurônios corticais de ratos SHR quando comparados ao seu controle.

Palavras-chave: TDAH, ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sinaptofisina, SNAP-25, CREB, pro-BDNF.



## **1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA**

### **1.1. O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)**

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns da infância caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Atualmente cerca de 5% da população infantil e 2,5% dos adultos no mundo todo são diagnosticados com TDAH (Faraone et al., 2015). Das crianças diagnosticadas com o transtorno, há casos que podem continuar apresentando os sintomas na adolescência e também pela vida adulta (Faraone et al., 2003). Com o avanço da idade, os sintomas de hiperatividade e impulsividade diminuem, permanecendo os sintomas de desatenção (Palma et al., 2015). Estudos epidemiológicos têm mostrado que o sexo masculino, o baixo nível socioeconômico e a idade jovem estão associados com o aumento da prevalência do transtorno (Biederman e Faraone, 2005). A taxa de diagnóstico é maior em meninos do que em meninas, na proporção de 2,4:1 em estudos de população, e de 4:1 em estudos clínicos (Polanczyk et al., 2007). Essa variabilidade no diagnóstico pode ser explicada pelo fato de que os meninos apresentam com maior frequência os sintomas de hiperatividade enquanto as meninas tem o subtipo desatento mais prevalente (Biederman et al., 2002).

#### **1.1.1. Etiologia do TDAH**

O TDAH é uma desordem neurocomportamental heterogênea, fenotipicamente complexa e de causa ainda desconhecida. Acredita-se que a interação de diferentes fatores e o acúmulo de seus efeitos aumente a vulnerabilidade ao transtorno (Faraone e Biederman, 1998). Baixo peso ao nascer, hipóxia pré-natal (Saigal et al., 2003), complicações do feto durante a gestação como a toxemia e exposição crônica do feto a nicotina (Linnet et al., 2003) são alguns fatores biológicos de risco relacionados com o TDAH (Bradley e Golden, 2001). Além desses, classe social baixa, criminalidade paterna, desordem mental materna, tamanho da família e discórdia conjugal são fatores psicossociais que também estão relacionados com o transtorno (Burgueño et al., 2007).

Como há muitas evidências que apontam para uma disfunção dopaminérgica, o uso de estimulantes como metilfenidato ou anfetamina são o tratamento de primeira linha para tratar os sintomas do TDAH, pois essas drogas inibem o transportador de dopamina e aumentam os seus níveis sinápticos (Stein, 2004). Os estudos com modelos animais também confirmam que

as anormalidades na neurotransmissão dopaminérgica resultam na falta de controle motor e em outras condições do transtorno (Sagvolden et al., 2005). Os estudos de neuroimagem realizados em pacientes com TDAH revelaram pequenas reduções de volume em áreas com inervação dopaminérgica predominante tais como o córtex pré-frontal, giro cingulado e gânglio basal anterior (Filipek et al., 1997).

### **1.1.2. Sintomas e comorbidades**

As crianças em que há predominância do sintoma de desatenção geralmente apresentam mais dificuldade na escola e na conclusão de trabalhos de casa, enquanto as crianças com sintomas de hiperatividade ou impulsividade apresentam comportamentos geralmente confundidos com indisciplina (Spencer et al., 2007). Na população adolescente há maior risco para baixo rendimento acadêmico com aumento das taxas de abandono escolar. Os problemas decorrentes da baixa auto-estima incluem a dificuldade nas relações interpessoais e parentais. Se não houver tratamento durante a adolescência, há relatos de aumento para o risco de delinquência, tabagismo e abuso de substâncias (Biederman et al., 2005). Na população adulta, os sintomas do TDAH tendem a ser mais heterogêneos e sutis. A hiperatividade apresenta-se como estar em constante atividade, excesso de programações e busca por cargos atarefados, enquanto que a impulsividade se manifesta por meio de término prematuro de relacionamentos e impaciência para execução de tarefas que requeiram tempo. A desatenção é evidente nas tarefas que exigem organização e atenção sustentada ao longo do tempo, bem como dificuldades com a gestão do tempo e da memória e frequente procrastinação (Weiss e Weiss, 2004). Estes comportamentos podem causar transtornos nas relações interpessoais, perturbação do ambiente de trabalho e, inclusive, causar danos para o próprio paciente (Biederman et al., 2005).

O TDAH pode estar associado a comorbidades de âmbito psiquiátrico, incluindo transtorno opositivo desafiador, transtorno de conduta, dificuldades de aprendizagem, desordem afetiva, ansiedade e transtornos de humor unipolar e bipolar (Kadesjo e Gillberg, 2001). Além disso, alguns estudos relataram a associação do TDAH com o risco de transtorno de personalidade borderline na vida adulta (Philipsen, 2006). A depressão maior compartilha critérios de diagnóstico de distúrbios psicomotores e incapacidade de concentração, enquanto o transtorno bipolar compartilha características de agitação psicomotora, distração e falar mais do que o habitual. Finalmente, o transtorno de ansiedade generalizada compartilha os sintomas de inquietação e diminuição da capacidade de concentração (Faraone et al., 2005).

### **1.1.3. Diagnóstico e tratamento**

Embora tenha aumentado o conhecimento sobre as bases biológicas do TDAH, o diagnóstico permanece sendo essencialmente clínico (Kieling e Rohde, 2012), baseado no DSM-5 (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), da Associação Americana de Psiquiatria Americana (APA, 2013), e na CID-10 (Classificação Internacional de Doenças), da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992). O DSM-5 identifica três principais apresentações de TDAH: a predominantemente desatenta, a predominantemente hiperativa/impulsiva e a combinada. Os subtipos do transtorno podem ser difíceis de serem estabelecidos em certos casos devido a sua complexidade, e a gravidade dos sintomas para cada indivíduo pode depender de fatores ambientais e outros sintomas psiquiátricos comórbidos (Beane e Marrocco, 2004). As taxas de prevalência na infância e na vida adulta variam conforme o país em análise, e isso provavelmente é devido ao critério utilizado para definir o transtorno. No entanto, o histórico familiar de TDAH, a comorbidade psiquiátrica e a adversidade psicossocial têm sido relatados como fatores que aumentam a probabilidade de haver persistência do transtorno na vida adulta (Biederman et al., 2005).

Os estimulantes são a intervenção de primeira escolha (Moriyama et al., 2013), sendo o metilfenidato o mais utilizado em adultos e o mais recomendado para crianças e adolescentes (Seixas et al., 2012). O mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido, mas ocorre a inibição da recaptação de dopamina e norepinefrina no neurônio pré-sináptico e/ou o aumento da sua liberação, levando a um aumento na concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica (Inglis et al., 2016). O metilfenidato é considerado uma das drogas mais eficazes da Psiquiatria e da Medicina (Leucht et al., 2012) com cerca de 65% das crianças diagnosticadas com TDAH respondendo ao tratamento. Além do tratamento farmacológico, tratamentos psicossociais ou intervenções terapêuticas comportamentais são utilizados para melhorar a qualidade de vida do paciente (Swanson et al., 1998).

### **1.1.4. Genética**

O TDAH apresenta uma etiologia complexa e multifatorial com um forte componente genético que desempenha um papel importante no desenvolvimento e evolução da doença. Esse transtorno apresenta polimorfismos no alelo 480-bp do transportador de dopamina (DAT) (Barr et al., 2001) e no receptor D4 (DRD4) (Faraone et al., 2001; Biederman, 2005).

Há também estudos mostrando o envolvimento dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico no transtorno (Banaschewski et al., 2010). Outros grupos, utilizando camundongos (Tsai, 2007) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Jeong et al., 2014), sugerem que a redução na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), proteína essencial para o desenvolvimento e maturação das sinapses, pode desempenhar um papel na patogenia do TDAH. Análise de polimorfismos nos genes que codificam a SNAP-25 (proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma) e a sinaptofisina em diferentes populações reforçou a evidência de associação desses genes com o transtorno (Gálvez et al., 2014; Gao et al., 2015). Camundongos mutantes coloboma, com mutação por deleção do gene da SNAP-25, apresentaram hiperatividade espontânea e atraso em algumas habilidade motoras neonatais (Wilson, 2000). O aumento da sinalização do CREB (proteína de ligação ao AMPc), envolvido na transcrição de genes essenciais para o desenvolvimento e a fisiologia do sistema nervoso central, como o BDNF (Connolly and Kingsbury, 2010), também pode estar relacionado com o transtorno (D'Andrea et al., 2015).

Um estudo (Sprich et al., 2000) descreveu maiores taxas de TDAH entre os parentes biológicos de crianças com o transtorno quando comparado com os parentes adotivos de crianças com TDAH, reforçando esse fator genético do transtorno. Estudos comparando gêmeos monozigóticos, que compartilham todos os genes, e dizigóticos, que compartilham somente metade de seus genes, mostram que a taxa de probabilidade do TDAH é maior nos monozigóticos (Biederman e Faraone, 2005; Faraone et al., 2005). Assim como o TDAH, outras desordens do neurodesenvolvimento como transtorno de conduta (Christiansen et al., 2008), problemas de desempenho cognitivo, desordens do espectro autista (Rommelse et al., 2010) e os transtornos de humor também apresentam grande influência genética (Faraone et al., 2015).

### **1.1.5. Modelo animal**

Dentre os modelos animais sugeridos e utilizados para os estudos do TDAH, encontram-se listados a seguir: camundongos nocaute para o transportador de dopamina (DAT-KO), ratos Wistar-Kyoto Hiperativos (WKHA), ratos Naples com alta excitabilidade (NHE) e camundongos mutantes coloboma (nocaute no gene SNAP-25) (Sagvolden, 2005). Entretanto, poucos preenchem os três critérios de validação essenciais para o modelo (Sagvolden et al, 2009). Nesse sentido, um dos modelos animais mais validados para estudar

o TDAH é a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) (Roessner et al., 2010).

Esse modelo foi desenvolvido na cidade de Kyoto, Japão, por Okamoto e Aoki em 1963 a partir de progenitoras Wistar-Kyoto (WKY). Os animais SHR manifestam a hipertensão na vida adulta, sendo um modelo amplamente utilizado em estudos sobre doenças cardiovasculares (Li et al., 2007). No entanto, antes desse período da vida adulta, esses animais apresentam manifestações comportamentais associadas ao TDAH: comprometimento da atenção, aumento na sua atividade locomotora (hiperatividade) e impulsividade (Meneses et al., 2011), preenchendo assim o critério de validade de face. Os SHR apresentam anormalidades no sistema dopaminérgico que incluem diminuições dos níveis de dopamina no estriado, núcleo caudato e accumbens, bem como reduções no volume do estriado, apresentando assim validade de construto (Simchon et al., 2010). O modelo responde ao metilfenidato, sendo capaz de prever correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere ao comportamento, genética e funções neuronais não mostrados anteriormente na prática clínica. Portanto, o modelo preenche o critério de validade preditiva (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2005).

A atividade dopaminérgica neuronal é essencial para a execução de algumas funções atribuídas ao córtex pré-frontal tais como: o controle do impulso, resposta inibitória, memória de trabalho, flexibilidade cognitiva, planejamento, julgamento e tomada de decisão (Logue e Gould., 2014). Estudos sugerem que ocorre uma hiperfunção do sistema noradrenérgico e uma hipofunção do sistema dopaminérgico na região do córtex pré-frontal de ratos SHR quando comparados ao seu controle WKY (Russel, 2002). Esse desbalanço entre os dois sistemas acarreta em alterações comportamentais semelhantes às observadas no TDAH. Além disso, o estudo de Li et al. (2007) mostrou que a expressão do gene do receptor de dopamina D4 (DRD4) e a síntese proteica desse receptor no córtex pré-frontal de ratos SHR foi menor quando comparado ao controle WKY. O transportador de dopamina (DAT), responsável pela captação de dopamina na fenda sináptica, apresenta aumento de sua expressão no córtex pré-frontal e no estriado de ratos SHR, embora a transmissão dopaminérgica esteja reduzida (Pandolfo et al., 2013; Viggiano et al., 2004).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O isolamento de neurônios em cultura é amplamente utilizado para melhor compreender os processos de desenvolvimento, diferenciação e maturação dessas células do sistema nervoso central. Dada a sua susceptibilidade frente a agentes neurotóxicos e a sua resposta a fármacos neuroprotetores, os mecanismos envolvidos nos processos de morte neuronal também podem ser avaliados (Gordon et al., 2013). Com base nos estudos em modelos animais que sugerem uma redução na expressão do BDNF e polimorfismos para os genes que codificam as proteínas sinaptofisina e SNAP-25, é importante investigar o impacto dessas modificações a nível neuronal. Visto que o TDAH é um transtorno do neurodesenvolvimento, torna-se importante caracterizar o padrão de desenvolvimento dos neurônios do córtex pré-frontal a partir de um modelo animal validado para os estudos deste transtorno. Uma vez estabelecidas as modificações neuroanatômicas e nos níveis de proteínas importantes para a formação e funcionamento das sinapses no modelo experimental do TDAH, torna-se possível investigar intervenções terapêuticas que contribuam para a melhoria dos sintomas e também para um melhor entendimento desse transtorno.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

Identificar parâmetros neuroquímicos e morfométricos em neurônios de córtex pré-frontal do modelo murino para o TDAH.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Verificar o imunoconteúdo das proteínas sinaptofisina, SNAP-25, CREB e pro-BDNF encontradas na linhagem SHR quando comparadas com o seu controle (WKY).
- Realizar uma comparação morfométrica do desenvolvimento *in vitro* dos neurônios das linhagens SHR e WKY ao longo de diferentes dias sobre os seguintes parâmetros: comprimento total dos neuritos, comprimento máximo do neurito, número de raízes e número de pontos de ramificação.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

**Periódico:** Neurobiology of Disease

**Título:** Análise neuroquímica de culturas de neurônios corticais do modelo murino do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

**Normas da revista:** disponível em <https://www.elsevier.com/journals/neurobiology-of-disease/0969-9961?generatepdf=true> e Anexo I.



ANÁLISE NEUROQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DO MODELO MURINO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Daniela Melo Marques, Catiane Bisognin Alves, Amanda Staldoni Almeida, Lisiane de Oliveira Porciúncula\*

Laboratórios de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, 90035-003. Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor correspondente: Laboratórios de Estudos sobre o Sistema Purinérgico, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55 51 3308 5540.

Endereço de e-mail: loporciuncula@yahoo.com (LO Porciúncula).

## RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns da infância caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. A cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *Spontaneously hypertensive rats*) é um dos modelos animais mais validados para estudar o TDAH. Neste trabalho, caracterizamos o padrão de desenvolvimento neuronal utilizando a cepa de ratos SHR. Foram cultivados neurônios do córtex pré-frontal de ratos SHR e KYOTO. A partir de diferentes dias de cultura *in vitro* (DIV), os neurônios foram utilizados para quantificar o imunoconteúdo das proteínas sinaptofisina, SNAP-25, CREB e pro-BDNF. O desenvolvimento neuronal *in vitro* ao longo dos dias 1, 2 e 5 foi avaliado por meio de uma análise morfométrica. No primeiro DIV verificou-se um aumento do imunoconteúdo da sinaptofisina no SHR quando comparado ao seu controle. Já o imunoconteúdo do CREB foi menor no SHR. No segundo DIV o imunoconteúdo da SNAP-25 aumentou nos neurônios da linhagem SHR. No quinto DIV o imunoconteúdo da sinaptofisina foi maior na SHR, enquanto que o imunoconteúdo da SNAP-25 e do pro-BDNF foram menores na SHR. Com relação aos parâmetros morfométricos, a linhagem SHR apresentou uma redução no comprimento total dos neuritos nos DIV 2, 5 e 8. Na análise do número de raízes, houve redução deste parâmetro na linhagem SHR nos DIV 2 e 8. Não houve diferença significativa entre as linhagens no número de raízes e no número de pontos de ramificação em nenhum dos DIV analisados. Esses resultados corroboram com estudos anteriores no que diz respeito a alterações de proteínas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência neuronal em um dos modelos animais mais validado para estudar o transtorno. O estudo morfométrico realizado fornece novas perspectivas para a compreensão de diferenças no desenvolvimento verificadas nos neurônios corticais de ratos SHR quando comparados ao seu controle.

Palavras-chave: TDAH, ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sinaptofisina, SNAP-25, CREB, pro-BDNF

## 1. Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns da infância caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Atualmente cerca de 5% da população infantil e 2,5% dos adultos no mundo todo são diagnosticados com TDAH (Faraone et al., 2015). O TDAH é uma desordem neurocomportamental heterogênea e fenotipicamente complexa de causa ainda desconhecida. Acredita-se que a interação de diferentes fatores e o acúmulo de seus efeitos aumente a vulnerabilidade ao transtorno (Faraone e Biederman, 1998).

Esse transtorno apresenta polimorfismos no transportador de dopamina (DAT) (Barr et al., 2001) e no receptor D4 (DRD4) (Faraone et al., 2001; Biederman, 2005), além de polimorfismos nos genes que codificam a proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma (SNAP-25) e a sinaptofisina (Gálvez et al., 2014; Gao et al., 2015). A redução na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Tsai, 2007; Jeong et al., 2014) e o aumento da sinalização da proteína de ligação ao AMPc (CREB) (D'Andrea et al., 2015) também podem desempenhar um papel na patogénia do TDAH.

Um dos modelos animais mais validados para estudar o TDAH é a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) (Roessner et al., 2010). Os animais SHR manifestam a hipertensão na vida adulta, sendo um modelo amplamente utilizado em estudos sobre doenças cardiovasculares (Li et al., 2007). No entanto, antes desse período da vida adulta, esses animais apresentam as principais características do TDAH de desatenção, hiperatividade e impulsividade (Meneses et al., 2011).

Com base nas alterações genéticas e proteicas encontradas no transtorno, torna-se importante verificar o impacto dessas modificações a nível neuronal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o padrão de desenvolvimento neuronal utilizando a cepa de ratos SHR. Foi realizada uma cultura primária de neurônios corticais a partir de embriões de ratos SHR comparados ao seu controle Wistar-Kyoto. Através da técnica *Western blot* foram identificados o imunoconteúdo de determinadas proteínas, e através da imunocitoquímica foi realizada uma comparação morfométrica do desenvolvimento dos neurônios das linhagens ao longo de diferentes dias *in vitro* (DIV).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Animais

Foram utilizadas para o estudo a cepa SHR, que foi criada a partir de progenitoras Wistar-Kyoto (WKY). Portanto, a cepa de ratos WKY foi selecionada como controle para a SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram alimentados com ração comercial e água à vontade e mantidos em gaiolas residência nas salas de experimentação do próprio Biotério, as quais apresentam temperatura de  $22 \pm 2$  °C, umidade entre 60-80 % e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com o Guia para Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (NIH Guide) e com a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS – Número de protocolo 29196).

### 2.2. Cultura primária de neurônios corticais

A cultura primária de neurônios de córtex pré-frontal foi obtida a partir de embriões de ratos SHR e WKY de 16-17 dias. Os córtices pré-frontais de um *pool* de embriões foram removidos e dissecados em uma placa de Petri contendo Solução Balanceada de Hank's (HBSS). A dissociação enzimática foi feita em uma solução contendo tripsina 0,25 %, à 37°C durante 10 minutos. A tripsina é inativada com solução contendo soro fetal bovino a 20% (Gibco). A suspensão celular, obtida após dissociação mecânica contendo DNase (Sigma, São Paulo/Brasil), é ressuspendida em meio Neurobasal com suplemento B27 contendo penicilina e estreptomicina. As células foram semeadas na densidade de 50.000 células em lamínulas de 16 mm revestidas com poli-D-lisina (50 µg/mL) (Sigma, São Paulo/Brasil). Foram também utilizadas células plaqueadas na densidade de 1,5 a 3 x 10<sup>6</sup>/mL para análise por *Western blot*. As células foram cultivadas em incubadora umidificada a 37°C numa atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> e 95% ar em meio Neurobasal suplementado (Gibco) contendo 0,2 mM de L-glutamina (*Thermo Fisher Scientific*), 2 % de suplemento B27 (Gibco) e 1% de penicilina e estreptomicina (*Thermo Fisher Scientific*).

### 2.3. Western blot

O imunoconteúdo de proteínas sinápticas de neurônios cultivados de córtex pré-frontal foi verificado em diferentes dias *in vitro*, de ambas as linhagens SHR e WKY.

O meio neurobasal foi retirado dos poços e foram realizadas três lavagens com PBS (tampão fostato-salino). As amostras foram raspadas das placas utilizando SDS 5% (dodecil sulfato de sódio) com 0,1% de inibidores de fosfatase e de protease (Sigma, São Paulo/Brasil) e armazenadas à -20°C. A quantificação de proteína total foi determinada pelo ensaio de ácido bicinonínico (BCA, Pierce), utilizando albumina sérica bovina (ASB) como padrão (Sigma-Aldrich, São Paulo/Brasil). As amostras foram normalizadas para a quantidade final de proteína entre 0,15-0,5 µg/µL. Cerca de 5 µg de proteína foram aplicadas e separadas em gel poli(acrilamida) por SDS-PAGE (12-14% o gel de corrida). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Amersham, São Paulo/Brasil). O bloqueio foi realizado durante 1h à temperatura ambiente. As membranas para marcação da sinaptofisina foram bloqueadas e incubadas com 5% leite desnatado em solução salina tamponada contendo Tris e 0,1% Tween-20 (TBS-T). Para as outras marcações, as membranas foram bloqueadas e incubadas com 3% ASB em solução salina tamponada com Tris e Tween-20 0,1% (TBS-T). A incubação foi *overnight* (durante a noite) à 4°C com os seguintes anticorpos primários: monoclonal de coelho anti-sinaptofisina (1:5000, Abcam), policlonal de coelho anti-SNAP-25 (1:10.000, Sigma), policlonal de coelho anti-pro-BDNF (1:1000, Abcam) e monoclonal de coelho anti-CREB (1:1000, Cell Signaling Technology). As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a *horseradish peroxidase* (HRP) por 2h à temperatura ambiente e a revelação foi feita com a adição do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, São Paulo/Brasil). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software ImageJ. A β-actina e a β-tubulina foram utilizadas como controle de carregamento, conforme a proteína em análise, sendo quantificadas pela incubação com os anticorpos monoclonal de camundongo anti-β-actina (1:30000, Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brasil) e monoclonal de camundongo anti-β-tubulina (1:10000, Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brasil), respectivamente.

#### 2.4. Imunocitoquímica

As células semeadas em lamínulas colocadas em placas de 12 poços foram coletadas para análise *in vitro* em diferentes dias: 1, 2, 5 e 8. O meio neurobasal dos poços foi retirado e foram realizadas três lavagens com PBS 1x. Para fixação dessas células, foi adicionada a

solução de paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas novamente três vezes com PBS 1x para posterior adição do tampão de bloqueio por 1h, que é uma solução de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (ASB), 5% de soro normal de cabra (NGS) e 0,2% de Triton X-100. Em seguida, essa solução foi retirada para a adição do anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-MAP-2, para marcação somatodendrítica dos neurônios (1:200, Santa Cruz Biotechnologies) diluído na solução de bloqueio. Após 2h de incubação do anticorpo primário, as lamínulas foram novamente lavadas três vezes com PBS 1x para posterior incubação do anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 (1:200, Invitrogen™) por 2h. Novamente, as lamínulas foram lavadas para adição durante 10 minutos do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,001%, Invitrogen™), utilizado como um marcador fluorescente de núcleos pela sua forte ligação com as regiões ricas em adenina e timina no DNA. Em outras lamínulas, para a visualização da citoarquitetura neuronal, foi adicionado o anticorpo monoclonal de camundongo *Fluoropan Neuronal Marker* conjugado com Alexa 488 (1:100, Millipore), diluído na solução de bloqueio por 2h. As lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia com auxílio de meio de montagem para fluorescência e visualizadas no microscópio Olympus IX70 invertido utilizando a objetiva de 40x. As imagens foram adquiridas em 8bits, com resolução digital 1376x1038 e foram capturadas cinco fotos de diferentes campos por lamínula. Para análise do *Fluoropan*, as imagens foram captadas utilizando a objetiva de 20x.

### 2.5. Análise morfológica

Com o auxílio de microscopia por fluorescência padrão, foram feitas as seguintes análises utilizando o software ImageJ: i) comprimento total dos neuritos, que corresponde a soma dos comprimentos de todos os processos emitidos a partir de um único neurônio; ii) comprimento máximo do neurito, que corresponde ao comprimento do processo mais longo de cada neurônio; iii) número de pontos de ramificação, que corresponde ao número total de ramificações em todos os processos de um único neurônio; iv) número de raízes, que corresponde ao número de neuritos primários originados a partir do corpo celular (Ribeiro et al., 2015).

### 2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student para comparar diferenças entre as duas linhagens. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média para os resultados de *Western blot*, e somente como média para os parâmetros morfométricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0* para Windows.

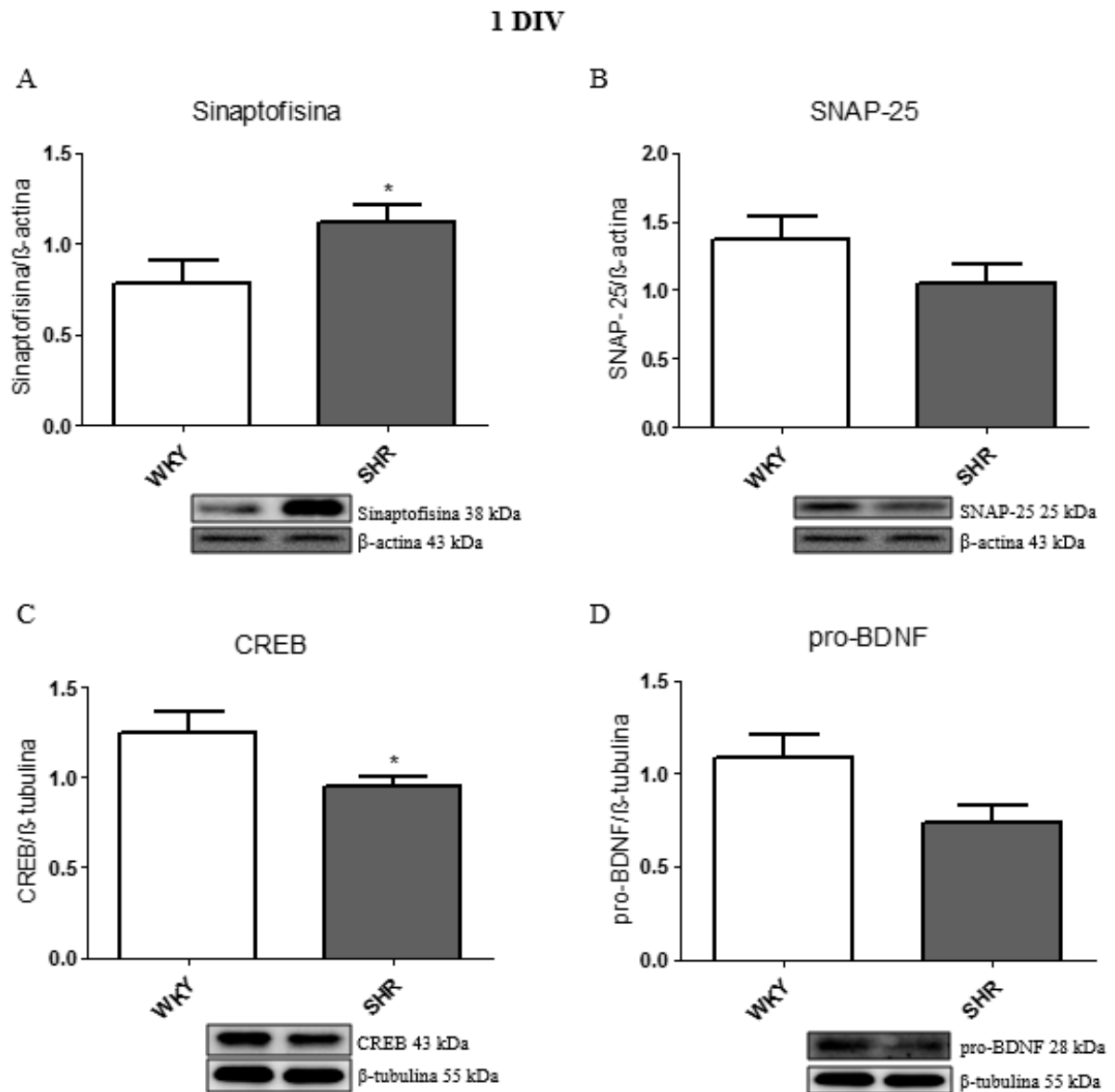
### 3. Resultados

#### 3.1. Alterações no imunocontéudo de proteínas nos neurônios SHR

A análise do imunocontéudo de proteínas no 1º DIV revelou aumento de 43,70% no imunocontéudo da sinaptofisina nos neurônios SHR ( $P = 0,0437$ ), quando comparado a WKY (Fig. 1A). Já o imunocontéudo do CREB foi significativamente menor ( $P = 0,0481$ ) no SHR (Fig. 1C), com redução de 24,21%. O imunocontéudo da SNAP-25 e do pro-BDNF não foi diferente entre os neurônios SHR e WYK (Fig. 1B e D).

No 2º DIV, o imunocontéudo da SNAP-25 aumentou 20,09% nos neurônios SHR ( $P = 0,0421$ ) (Fig. 2B). O imunocontéudo da sinaptofisina, do CREB e pro-BDNF não diferiu entre os neurônios (Fig. 2A, C e D).

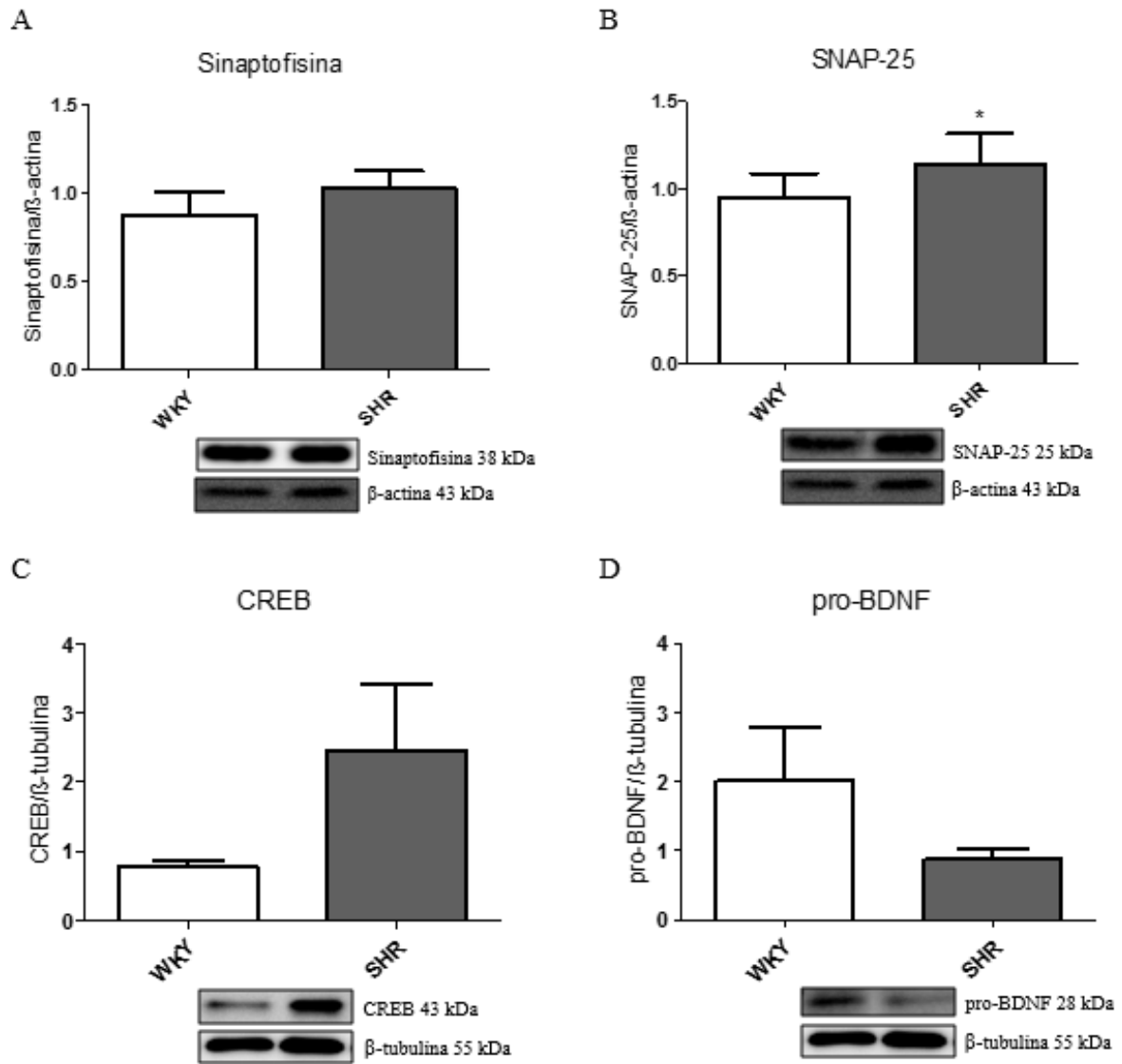
No 5º DIV, o imunocontéudo da sinaptofisina apresentou aumento de 51,77% nos neurônios SHR ( $P = 0,0414$ ) (Fig. 3A), enquanto que o imunocontéudo da SNAP-25 e do pro-BDNF diminuiu 15,90% e 39,62%, respectivamente ( $P = 0,0122$  e  $P = 0,0416$ ) (Fig. 3B e D). O imunocontéudo do CREB não foi alterado (Fig. 3C).



**Fig. 1.** Imunoconteúdo da sinaptofisina (A), da SNAP-25 (B), do CREB (C) e do pro-BDNF (D) de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no primeiro dia in vitro (1 DIV). Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$  amostras de diferentes culturas por linhagem) da densitometria obtida da razão proteína/ $\beta$ -actina (A e B) ou proteína/ $\beta$ -tubulina (C e D). \* $P<0,05$ , quando significativamente diferente do controle (WKY). Dados analisados por teste t de Student.

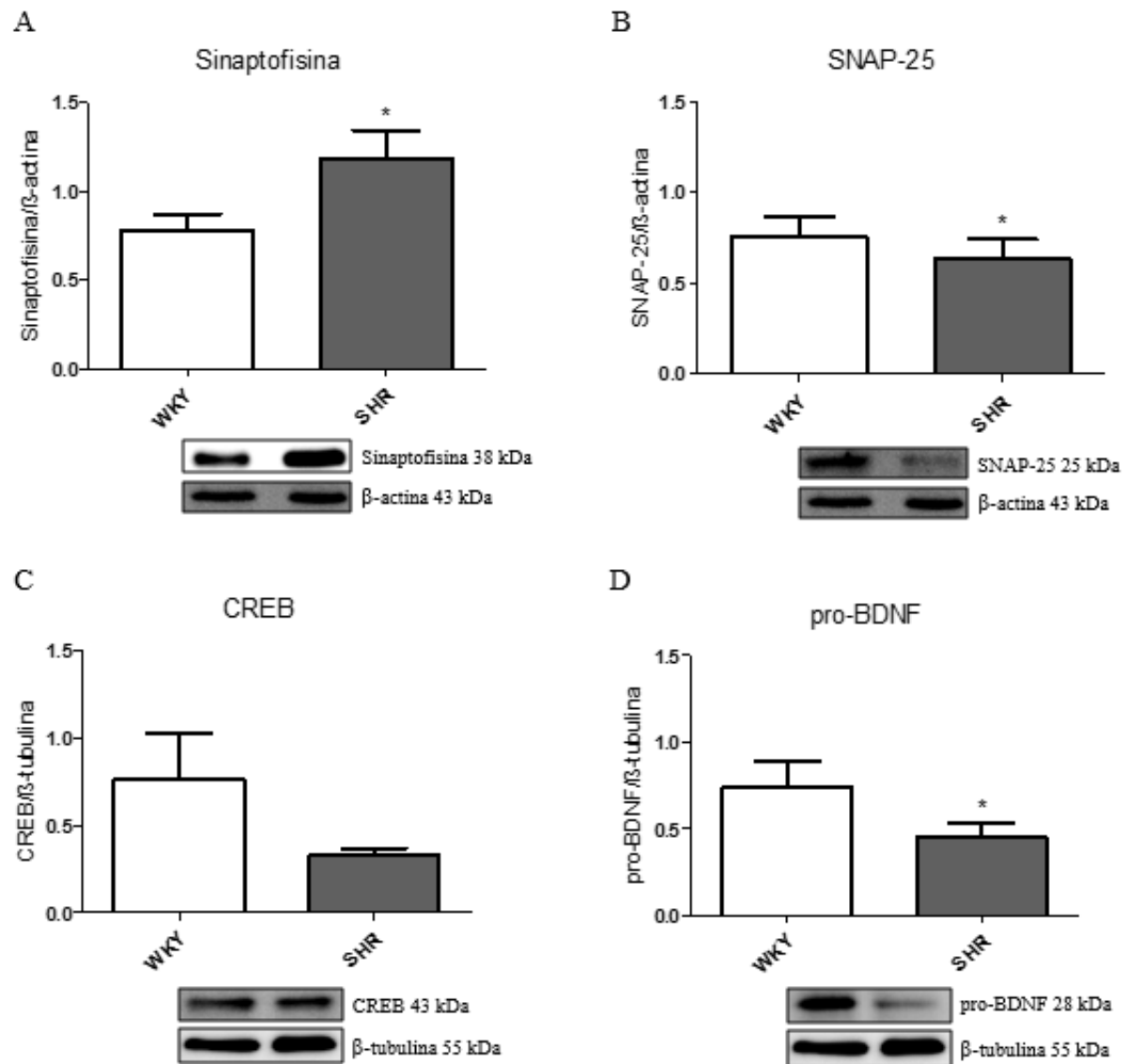


## 2 DIV



**Fig. 2.** Imunoconteúdo da sinaptofisina (A), da SNAP-25 (B), do CREB (C) e do pro-BDNF (D) de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no segundo dia in vitro (2 DIV). Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-6 amostras de diferentes culturas por linhagem) da densitometria obtida da razão proteína/ $\beta$ -actina (A e B) ou proteína/ $\beta$ -tubulina (C e D). \* $P < 0,05$ , quando significativamente diferente do controle (WKY). Dados analisados por teste t de Student.

## 5 DIV



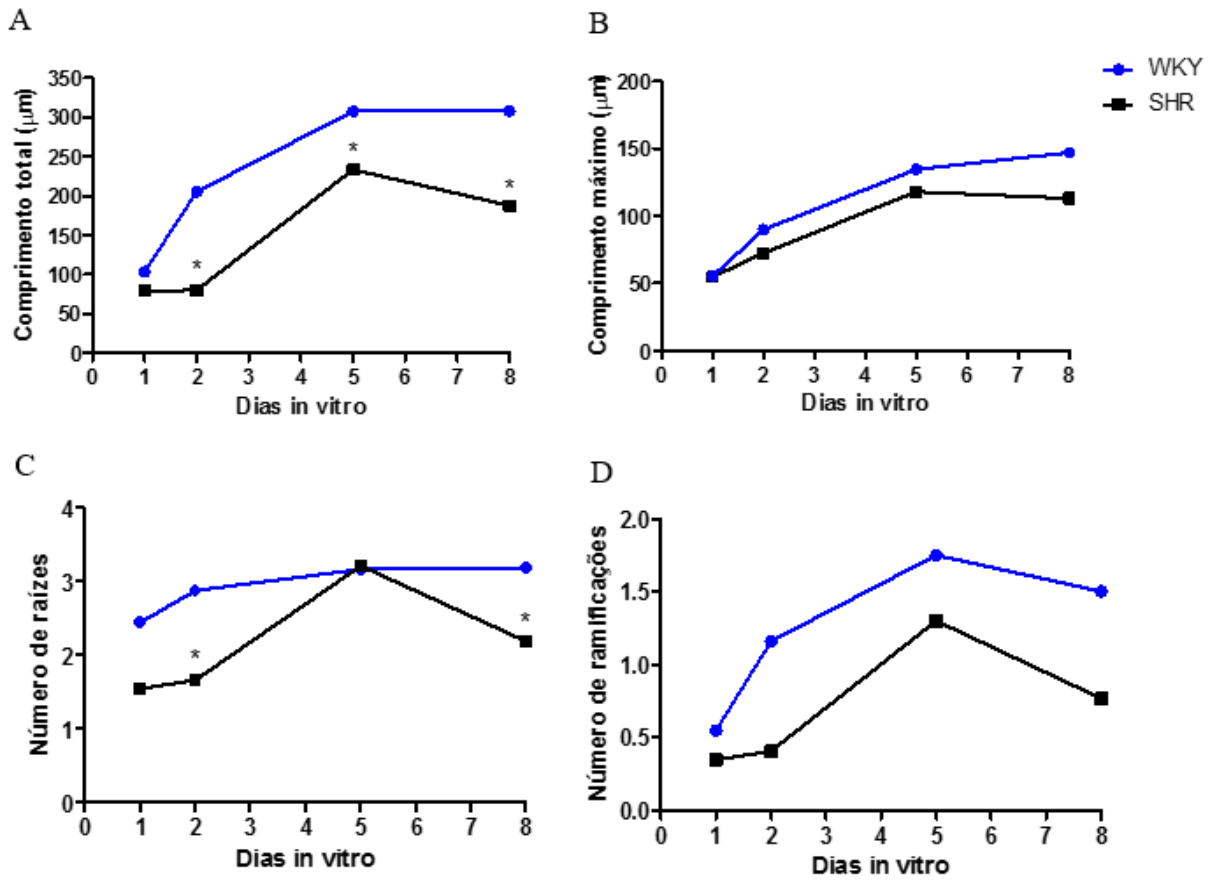
**Fig. 3.** Imunoconteúdo da sinaptofisina (A), da SNAP-25 (B), do CREB (C) e do pro-BDNF (D) de culturas primárias corticais neuronais das linhagens WKY e SHR no quinto dia in vitro (5 DIV). Os dados são representados por média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$  amostras de diferentes culturas por linhagem) da densitometria obtida da razão proteína/ $\beta$ -actina (A e B) ou proteína/ $\beta$ -tubulina (C e D). \* $P<0,05$ , quando significativamente diferente do controle (WKY). Dados analisados por teste t de Student.

### 3.2. Análise morfométrica

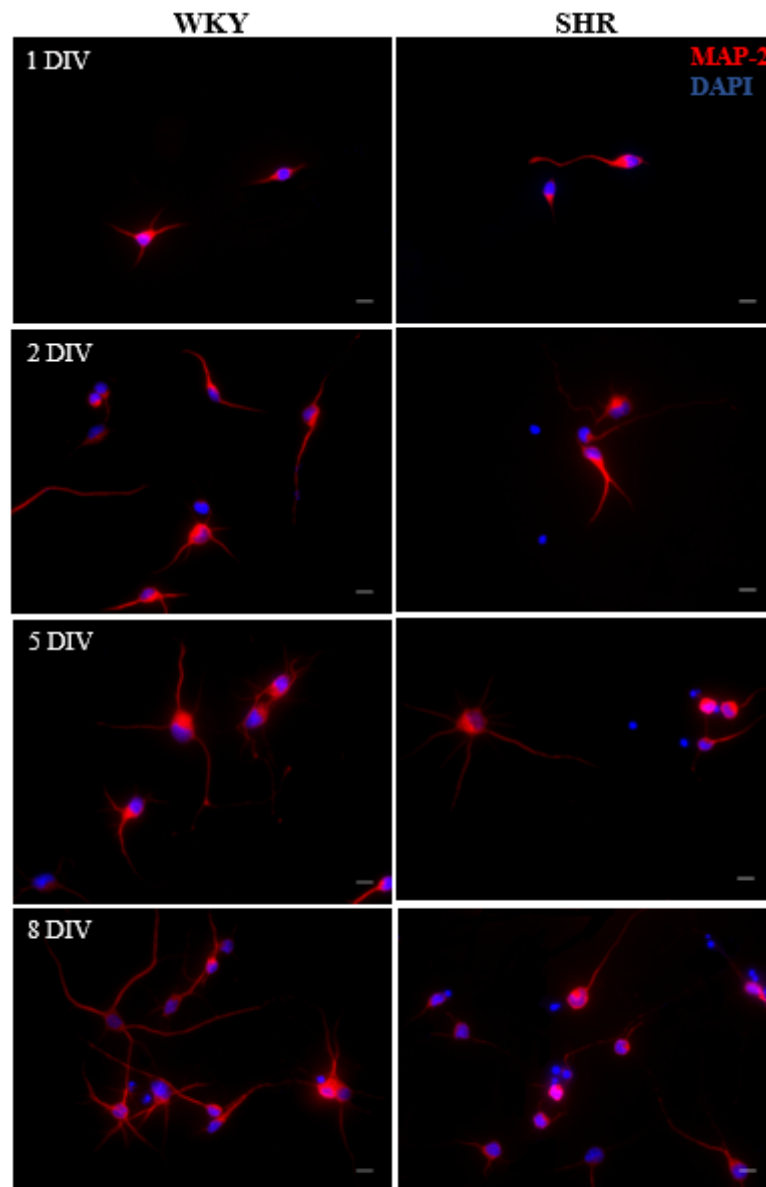
A incubação com anticorpo contra a MAP-2 (proteína associada a microtúbulo 2), proteína encontrada principalmente na região somatodendrítica (Ribeiro et al., 2015), foi realizada para a análise dos neuritos dos neurônios. Para a análise do comprimento total dos neuritos (soma do comprimento de todos os neuritos de cada neurônio), medido em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), os neurônios SHR apresentaram uma redução significativa do comprimento total no 2° DIV de 61,00%, no 5° DIV de 24,08% e no 8° DIV de 39,06% ( $P = 0,0395$ ,  $P = 0,0321$  e  $P = 0,0437$ , respectivamente) (Fig. 4A). No 1° DIV, não houve diferença no comprimento total dos neuritos entre os neurônios das duas cepas (Fig. 4A).

Para avaliar o comprimento máximo do neurito, foi mensurado o neurito de maior comprimento de cada neurônio em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Não houve alteração significativa desse parâmetro em nenhum dos dias *in vitro* analisados (Fig. 4B). Para análise do número de raízes, onde a soma das raízes emitidas por cada neurônio foram quantificadas, houve redução significativa nos neurônios SHR no 2° DIV de 42,08% e no 8° DIV de 39,48% ( $P=0,0321$  e  $P=0,0375$ , respectivamente) (Fig. 4C). Não foi possível detectar diferenças no número de raízes no 1° e 5° DIV (Fig. 4C). Com relação ao número de pontos de ramificação, onde as ramificações emitidas por cada neurônio foram somadas, não houve alteração significativa desse parâmetro em nenhum dos dias *in vitro* analisados (Fig. 4D).

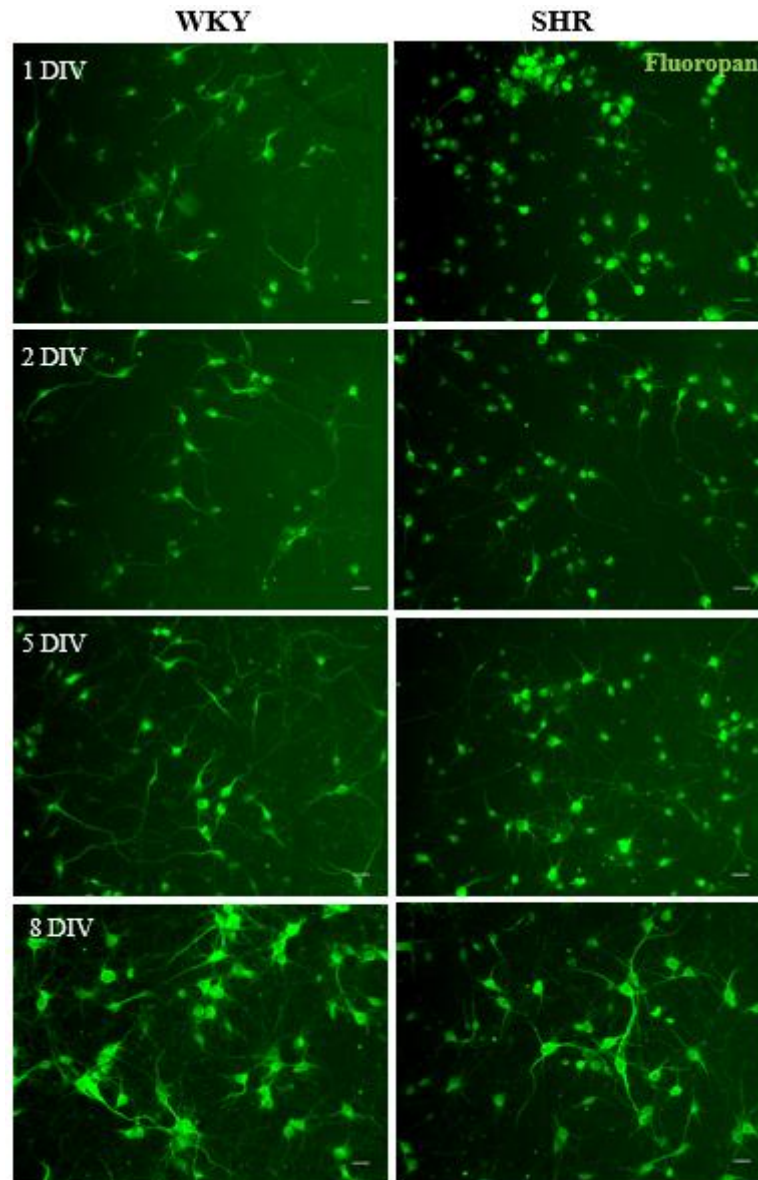
Um painel representativo da marcação com o anticorpo anti-MAP-2 é mostrado na Fig. 5. A incubação com o anticorpo *Fluoropan Neuronal Marker* foi realizada para verificação da citoarquitetura neuronal da cultura de neurônios corticais nas linhagens WKY e SHR. Um painel representativo dessa marcação é mostrado na Fig. 6.



**Fig. 4.** Análise morfométrica dos neurônios marcados com o anticorpo anti-MAP-2 para análise da região somatodendrítica. Os parâmetros analisados foram: comprimento total dos neuritos (A), comprimento máximo do neurito (B), número de raízes (C) e número de pontos de ramificação (D). Os dados são representados pela média ao longo de diferentes dias *in vitro* ( $n = 3$  culturas distintas, sendo analisados 20-40 neurônios por cultura conforme o dia *in vitro*). \* $P < 0,05$ , quando significativamente diferente do controle (WKY). Dados analisados por teste t de Student.



**Fig. 5.** Painel representativo dos neurônios marcados com o anticorpo anti-MAP-2 (em vermelho) para análise da região somatodendrítica e com DAPI (em azul) para marcação dos núcleos. A coluna da esquerda representa a linhagem controle WKY e a coluna da direita representa a linhagem SHR nos diferentes dias *in vitro* (DIV): 1, 2, 5 e 8. Fotografados com objetiva de 40x. Barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 6.** Painel representativo dos neurônios marcados com o anticorpo Fluoropan (em verde) para análise da morfologia. A coluna da esquerda representa a linhagem controle WKY e a coluna da direita representa a linhagem SHR nos diferentes dias *in vitro* (DIV): 1, 2, 5 e 8. Fotografados com objetiva de 20x. Barra de escala representa 20  $\mu$ m.

#### 4. Discussão

Neste estudo, culturas primárias de neurônios do córtex pré-frontal do modelo animal mais validado para os estudos de TDAH foram investigados quanto ao seu desenvolvimento e imunoconteúdo de proteínas sinápticas. Nos diferentes dias *in vitro* analisados foi possível observar alterações no imunoconteúdo das proteínas sinaptofisina, SNAP-25, CREB e pro-BDNF, as quais podem contribuir para o melhor entendimento das bases neurobiológicas deste transtorno. Foi possível também detectar e quantificar alterações morfométricas nos neurônios SHR, evidenciadas pela marcação com a proteína MAP-2 que permitiu verificar uma redução no comprimento total dos neuritos e no número de raízes em diferentes dias *in vitro* (DIV).

Devido a sua importância para o funcionamento das sinapses e seu papel na plasticidade sináptica, o gene SNAP25 tem sido estudado no TDAH. Tal gene codifica a proteína SNAP-25, uma proteína da membrana plasmática pré-sináptica que juntamente com a sintaxina-1 e a sinaptobrevina formam o complexo SNARE (do inglês *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), necessário para a fusão das vesículas na membrana plasmática para posterior exocitose (Wilson, 2000). A SNAP-25 é proteína mais estudada desse complexo, sua expressão é neuronal e está diretamente envolvida na liberação do neurotransmissor. Entretanto, as proteínas do complexo SNARE estão também envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso central. A SNAP-25 é expressa de forma abundante nos primeiros períodos pós-natal nos axônios e no corpo celular, mas muda a sua localização celular para os terminais nervosos no decorrer do desenvolvimento (Oyler et al. 1991). A SNAP-25 participa do brotamento e também da alongação dos neuritos (Shirasu et al. 2000; Kimura et al., 2003; Osen-Sand et al., 1993). Nos resultados obtidos neste estudo nos neurônios de córtex pré-frontal SHR foi possível verificar um aumento no 2º DIV no imunoconteúdo da SNAP-25, seguido de uma redução no 5º DIV. Portanto, no início do desenvolvimento dos neurônios a SNAP-25 aumentou seus níveis de forma significativa nos neurônios SHR, mas isso não se refletiu no aumento do comprimento total dos neuritos e nem no brotamento do número de raízes. Além disso, houve diminuição nos níveis da SNAP-25 no decorrer do desenvolvimento da cultura, algo que pode estar associado às reduções no comprimento dos neuritos e no número de raízes apresentados pelos neurônios SHR. Essas alterações nos níveis dessa proteína nos neurônios também corrobora com dados da literatura em que, no modelo de camundongo coloboma, sugere-se que o efeito seletivo de liberação de serotonina e de dopamina evocado pela despolarização tem relação

com um defeito na neuroexocitose dependente da SNAP-25. Isso é mais um indicativo de que a deficiência nos níveis da proteína SNAP-25 observada nos neurônios está relacionada com a perda do controle da atividade motora observado no modelo animal. Raber et al. (1997) avaliou a liberação de dopamina e serotonina *in vitro* de sinaptossomas e de fatias do estriado no modelo com deleção no gene SNAP25 e encontrou deficiência na liberação desses neurotransmissores.

Brookes et al. (2006) encontrou um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) numa região do gene SYP que codifica a proteína sinaptofisina nos pacientes com TDAH. No presente trabalho, verificou-se que o imunoconteúdo da sinaptofisina aumentou nos neurônios SHR no 1° e no 5° DIV. Considerando que a expressão da sinaptofisina pode ser correlacionada com a maturação neuronal (Calakos et al., 1996), os aumentos verificados na imunoreatividade dessa proteína sugerem uma aceleração da maturidade dos neurônios de córtex pré-frontal SHR. Entretanto, numa análise preliminar, qualitativa, pela marcação com Fluoropan, observamos que existe menor imunoreatividade nas culturas SHR nos diferentes DIV quando comparadas aos neurônios da cepa controle. Assim, não se pode descartar que esse aumento possa ser restrito a determinados subtipos neuronais. Seria necessária uma colocalização de diferentes marcadores de subtipos neuronais com a sinaptofisina para verificar essa hipótese. A sinaptofisina é a segunda proteína mais abundante nas vesículas sinápticas e forma um complexo proteico com a sinaptobrevina, sendo essencial para a recuperação eficiente desta proteína para as vesículas sinápticas após a endocitose (Gordon et al., 2011). Estudos estequiométricos revelam que existe um balanço muito refinado na proporção dessas duas proteínas para a manutenção da eficiência da neurotransmissão (Takamori et al., 2006). Uma outra possível implicação desse aumento da sinaptofisina nos neurônios SHR poderia ser implicado na sua funcionalidade. Se as alterações observadas para a sinaptofisina nos neurônios SHR fossem também observadas para a sinaptobrevina, isso seria um indicativo de comprometimento na neurotransmissão destes neurônios. De fato, anormalidades na proporção dessas duas proteínas acarretaram no atraso da endocitose, localização errônea da sinaptobrevina pela sua permanência nas membranas dos terminais nervosos, devido a um defeito no seu recrutamento para as vesículas sinápticas durante a endocitose (Gordon et al., 2013).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF em inglês) é uma das neurotrofinas responsáveis pela proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência de neurônios (Tsai, 2003). Além disso, o BDNF exerce influência na sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo, pois a redução na sua expressão pode levar à disfunção



dopaminérgica (Spina et al., 1992). Há duas formas do BDNF, com características de ligação diferentes que implicam em distintas atividades biológicas: a sua forma precursora pro-BDNF e o BDNF maduro (BDNF) (Liu et al., 2015). Kent et al. (2005) estudou o polimorfismo Val66Met, conhecido por ser uma mutação localizada no pro-BDNF, e associaram essa variação no gene com uma possível susceptibilidade ao TDAH. Além disso, camundongos nocaute para BDNF exibiram aumento na hiperatividade locomotora (Rios et al., 2001), uma das características comportamentais associadas ao transtorno. Neste estudo, foi encontrada uma tendência a diminuição nos níveis de proBDNF nos neurônios SHR nos primeiros DIV, com uma redução significativa no seu imunoconteúdo no 5º DIV. Os níveis do fator de transcrição CREB, que regula a expressão gênica do BDNF (entre outros genes), se encontra diminuído significativamente no 1º DIV, mas com uma tendência a se manter diminuídos nos outros dias. Portanto, os neurônios SHR apresentam uma deficiência na sinalização mediada pelo BDNF pela redução no seu fator de transcrição e na sua forma precursora. Espera-se, a partir de futuras determinações, que os níveis de BDNF possam também estar diminuídos nos neurônios SHR, o que estaria de acordo com observações prévias em que os níveis séricos de BDNF foram reduzidos em pacientes adultos com TDAH (Liu et al., 2015).

## 5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o conjunto de dados corrobora com estudos anteriores no que diz respeito às alterações em proteínas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência neuronal, e reforça o uso de um dos modelos animais mais validado para estudar o TDAH. As alterações morfométricas nos neurônios do córtex pré-frontal, oriundos do modelo animal, podem estar relacionadas a algumas alterações na expressão de genes posteriormente encontradas em pacientes com TDAH. Com essa abordagem que permite o acompanhamento do desenvolvimento e maturação neuronal, nossos resultados recapitulam eventos associados ao transtorno. Finalmente, a partir dessas observações, futuras experiências com os neurônios deste modelo animal serão delineadas para identificar os subtipos neuronais afetados anatomicamente e funcionalmente. Espera-se, com essa abordagem, contribuir para um melhor entendimento das bases neurobiológicas do TDAH.

## 6. Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse neste trabalho.

## Referências

- Barr, C.L., Xu, C., Kroft, J., Feng, Y., Wigg, K., Zai, G., Tannock, R., Schachar, R., Malone, M., Roberts, W., et al., 2001. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, v. 49, n. 4, p. 333-9.
- Biederman, J., 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1215-20.
- Brookes, K., Xu, X., Chen, W., Zhou, K., Neale, B., Lowe, N., Anney, R., Franke, B., Gill, M., Ebstein, R., et al., 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*, v. 11, n. 10, p. 934-53.
- Calakos N, Scheller R.H., 1996. Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: A molecular description. *Physiol Rev.*;76:1–29.
- D'Andrea, I., Fardella, V., Fardella, S., Pallante, F., Ghigo, A., Iacobucci, R., Maffei, A., Hirsch, E., Lembo, G., Carnevale, D., 2015. Lack of kinase-independent activity of PI3K $\gamma$  in locus coeruleus induces ADHD symptoms through increased CREB signaling. *EMBO Mol Med*, v. 7, n. 7, p. 904-17.
- Faraone, S.V., Asherson, P., Banaschewski, T., Biederman, J., Buitelaar, J.K., Ramos-Quiroga, J.A., Rohde, L.A., Sonuga-Barke, E.J.S., Tannock, R., Franke, B. 2015. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*, v. 1, p. 15020.
- Faraone, S.V.; Biederman, J., 1998. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, v. 44, n. 10, p. 951-8.
- Faraone, S.V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., Sklar, P., 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1313-23.
- Gálvez, J.M., Forero, D.A., Fonseca, D.J., Mateus, H.E., Talero-Gutierrez, C., Velez-van-Meerbeke, A., 2014. Evidence of association between SNAP25 gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Latin American sample. *Atten Defic Hyperact Disord*, v. 6, n. 1, p. 19-23.
- Gao, Q., Liu, L., Chen, Y., Li, H., Yang, L., Wang, Y., Qian, Q., 2015. Synaptosome-related (SNARE) genes and their interactions contribute to the susceptibility and working memory of attention-deficit/hyperactivity disorder in males. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 57, p. 132-9.
- Giordano, G.; Costa, L. G. 2011. Primary neurons in culture and neuronal cell lines for in vitro neurotoxicological studies. *Methods Mol Biol*, v. 758, p. 13-27.

- Gordon S.L., Leube R.E., Cousin M.A., 2011. Synaptophysin is required for synaptobrevin retrieval during synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* 31: 14032–14036.
- Gordon S.L., Cousin M.A., 2013. X-linked intellectual disability-associated mutations in synaptophysin disrupt synaptobrevin II retrieval. *J Neurosci* 33: 13695–13700.
- Jeong, H. I., Ji, E. S., Kim, S. H., Kim, T. W., Baek, S. B., Choi, S. W., 2014. Treadmill exercise improves spatial learning ability by enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the attention-deficit/hyperactivity disorder rats. *J Exerc Rehabil*, v. 10, n. 3, p. 162-7.
- Kent, L., Green, E., Hawi, Z., Kirley, A., Dudbridge, F., Lowe, N., Raybould, R., Langley, K., Bray, N., Fitzgerald, M., et al. 2005. Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD. *Mol Psychiatry*, v. 10, n. 10, p. 939-43.
- Kimura K, Mizoguchi A, Ide C., 2003. Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J Histochem Cytochem* 51:429–433.
- Li, Q., Lu, G., Antonio, G.E., Mak, Y.T., Rudd, J.A., Fan, M., Yew, D.T., 2007. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. *Neurochem Int*, v. 50, n. 6, p. 848-57.
- Liu, D.Y., Shen, X.M., Yuan, F.F., Guo, O.Y., Zhong, Y., Chen, J.G., Zhu, L.Q., Wu, J., 2015. The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. *Mol Neurobiol*, v. 52, n. 3, p. 1467-76.
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Ponce-Lopez, T., Tellez, R., Gallegos-Cari, A., Castillo, C., 2011. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Rev Neurosci*, v. 22, n. 3, p. 365-71.
- Osen-Sand A., Catsicas M., Staple J.K., Jones, K.A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., Catsicas, S., 1993. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Lett Nat* 364:445–448.
- Oyler G.A., Polli J.W., Wilson M.C., Billingsley M.L., 1991. Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5247–5251.
- Raber, J., Mehta, P.P., Kreifeldt, M., Parsons, L.H., Weiss, F., Bloom, F.E., Wilson, M.C., 1997. Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. *J Neurochem*, v. 68, n. 1, p. 176-86.
- Ribeiro, F.F., Nesves-Tomé, R., Assaife-Lopes, N., Santos, T.E., Silva, R.F., Brites, D., Ribeiro, J.A., Sousa, M.M., Sebastião, A.M., 2015. Axonal elongation and dendritic branching is enhanced by adenosine A2A receptors activation in cerebral cortical neurons. *Brain Struct Funct*.

Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., Jaenisch, R., 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, v. 15, n. 10, p. 1748-57.

Roessner, V., Sagvolden, T., Dasbanerjee, T., Middleton, F.A., Faraone, S.V., Walaas, S.I., Becker, A., Rothenberger, A., Bock, N., 2010. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. *Neuroscience*, v. 167, n. 4, p. 1183-91.

Shirasu M., Kimura K., Kataoka M., Takahashi, M., Okajima, S., Kawaguchi, S., Hirasawa, Y., Ide, C., Mizoguchi, A., 2000. VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci Res* 37:265–275.

Spina, M.B., Squinto, S.P., Miller, J., Lindsay, R.M., Hyman, C., 1992. Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem*, v. 59, n. 1, p. 99-106.

Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Gronborg M., Riedel D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831–846.

Tsai, S.J., 2003. Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: a speculative hypothesis. *Med Hypotheses*, v. 60, n. 6, p. 849-51.

Tsai, S.J., 2007. Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: clinical and therapeutic implications. *Med Hypotheses*, v. 68, n. 4, p. 896-9.

Wilson, M.C., 2000. Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesis and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 24, n. 1, p. 51-7.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estudos anteriores no que diz respeito a alterações de proteínas essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência neuronal em um dos modelos animais mais validados para estudar o transtorno. No primeiro dia, verificou-se um aumento *in vitro* do imunocontéudo da sinaptofisina no SHR quando comparado ao seu controle. Já o imunocontéudo do CREB foi menor no SHR. No segundo dia, o imunocontéudo *in vitro* da SNAP-25 aumentou nos neurônios da linhagem SHR. No quinto dia, o imunocontéudo *in vitro* da sinaptofisina foi maior na SHR, enquanto que o imunocontéudo da SNAP-25 e do pro-BDNF foram menores na SHR. Com relação aos parâmetros morfométricos, a linhagem SHR *in vitro* apresentou uma redução no comprimento total nos dias 2, 5 e 8. Na análise do número de raízes, houve redução deste parâmetro na linhagem SHR nos dias 2 e 8. Não houve diferença significativa entre as linhagens quanto ao número de raízes e ao número de pontos de ramificação em nenhum dos dias analisados *in vitro*. Esse estudo morfométrico fornece novas perspectivas para a compreensão de diferenças no desenvolvimento verificadas nos neurônios corticais de ratos SHR quando comparados ao seu controle.

Como perspectivas, pretendemos aumentar o número amostral para análise do imunocontéudo das proteínas analisadas. Além disso, a quantificação do imunocontéudo do BDNF e do CREB fosforilado é necessária para verificar e confirmar as alterações observadas no pro-BDNF e no CREB. Para a análise morfométrica, também pretendemos aumentar o número amostral para confirmar os dados obtidos. Também pretendemos analisar o crescimento axonal através da marcação com a Tau, um marcador específico do axônio, e analisar os terminais sinápticos dos neurônios através da marcação com o anticorpo anti-SNAP-25.

## REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington, DC: *American Psychiatric Publishing*, 2013.
- BANASCHEWSKI, T. et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, v. 19, n. 3, p. 237-57, Mar 2010.
- BEANE, M.; MARROCCO, R. T. Norepinephrine and acetylcholine mediation of the components of reflexive attention: implications for attention deficit disorders. *Prog Neurobiol*, v. 74, n. 3, p. 167-81, Oct 2004.
- BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, v. 366, n. 9481, p. 237-48, 2005 Jul 16-22 2005a.
- BIEDERMAN, J. et al. Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. *Biol Psychiatry*, v. 55, n. 7, p. 692-700, Apr 2004.
- BIEDERMAN, J. et al. Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. *Am J Psychiatry*, v. 159, n. 1, p. 36-42, Jan 2002.
- BRADLEY, J. D.; GOLDEN, C. J. Biological contributions to the presentation and understanding of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review. *Clin Psychol Rev*, v. 21, n. 6, p. 907-29, Aug 2001.
- BURGUEÑO J.; FRANCO R.; CIRUELA F. Attention Deficit and Hyperactivity disorders. In: Buschmann, Díaz JL, Holenz J, Párraga A, Torrens A, Vela JM, editors. *Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics*. Wiley-VCH; 2007; 1090–1182.
- CHRISTIANSEN, H. et al. Co-transmission of conduct problems with attention-deficit/hyperactivity disorder: familial evidence for a distinct disorder. *J Neural Transm (Vienna)*, v. 115, n. 2, p. 163-75, 2008.
- CONNOLLY, S.; KINGSBURY, T. J. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 397, n. 2, p. 152-6, Jun 2010.
- FARAONE, S. V. et al. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, v. 158, n. 7, p. 1052-7, Jul 2001.
- FARAONE, S. V. et al. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry*, v. 2, n. 2, p. 104-13, Jun 2003.
- FILIPEK, P. A. et al. Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. *Neurology*, v. 48, n. 3, p. 589-601, Mar 1997.
- FRICK, P. J. et al. Academic underachievement and the disruptive behavior disorders. *J Consult Clin Psychol*, v. 59, n. 2, p. 289-94, Apr 1991.

GORDON, J.; AMINI, S.; WHITE, M. K. General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol*, v. 1078, p. 1-8, 2013.

INGLIS, S. K. et al. Prospective observational study protocol to investigate long-term adverse effects of methylphenidate in children and adolescents with ADHD: the Attention Deficit Hyperactivity Disorder Drugs Use Chronic Effects (ADDUCE) study. *BMJ Open*, v. 6, n. 4, p. e010433, 2016.

KADESJÖ, B.; GILLBERG, C. The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children. *J Child Psychol Psychiatry*, v. 42, n. 4, p. 487-92, May 2001.

KIELING, R.; ROHDE, L. A. ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. *Curr Top Behav Neurosci*, v. 9, p. 1-16, 2012.

LEUCHT, S. et al. Putting the efficacy of psychiatric and general medicine medication into perspective: review of meta-analyses. *Br J Psychiatry*, v. 200, n. 2, p. 97-106, Feb 2012.

LINNET, K. M. et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry*, v. 160, n. 6, p. 1028-40, Jun 2003.

LOGUE, S. F.; GOULD, T. J. The neural and genetic basis of executive function: attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 123, p. 45-54, Aug 2014.

MORIYAMA, T. S. et al. Psychopharmacology and psychotherapy for the treatment of adults with ADHD—a systematic review of available meta-analyses. *CNS Spectr*, v. 18, n. 6, p. 296-306, Dec 2013.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, v. 27, p. 282-93, Mar 1963.

PALMA, S. M.; NATALE, A. C.; CALIL, H. M. A 4-Year Follow-Up Study of Attention-Deficit Hyperactivity Symptoms, Comorbidities, and Psychostimulant Use in a Brazilian Sample of Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Front Psychiatry*, v. 6, p. 135, 2015.

PANDOLFO, P. et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 23, n. 4, p. 317-28, Apr 2013.

PHILIPSEN, A. Differential diagnosis and comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and borderline personality disorder (BPD) in adults. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v. 256 Suppl 1, p. i42-6, Sep 2006.

POLANCZYK, G. et al. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry*, v. 164, n. 6, p. 942-8, Jun 2007.

ROMMELSE, N. N. et al. Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, v. 19, n. 3, p. 281-95, Mar 2010.

RUSSELL, V. A. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res*, v. 130, n. 1-2, p. 191-6, Mar 2002.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev*, v. 24, n. 1, p. 31-9, Jan 2000.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1239-47, Jun 2005a.

SAGVOLDEN, T. et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 7-8, p. 619-26, Dec 2009.

SAIGAL, S. et al. Psychopathology and social competencies of adolescents who were extremely low birth weight. *Pediatrics*, v. 111, n. 5 Pt 1, p. 969-75, May 2003.

SEIXAS, M.; WEISS, M.; MÜLLER, U. Systematic review of national and international guidelines on attention-deficit hyperactivity disorder. *J Psychopharmacol*, v. 26, n. 6, p. 753-65, Jun 2012.

SILVA, C. G. et al. Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*, v. 27, n. 2, p. 182-9, Aug 2007.

SIMCHON, Y.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 10, p. 714-20, Oct 2010.

SPENCER, T. J.; BIEDERMAN, J.; MICK, E. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *J Pediatr Psychol*, v. 32, n. 6, p. 631-42, Jul 2007.

SPRICH, S. et al. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 39, n. 11, p. 1432-7, Nov 2000.

STEIN, M. A. Innovations in attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacotherapy: long-acting stimulant and nonstimulant treatments. *Am J Manag Care*, v. 10, n. 4 Suppl, p. S89-98, Jul 2004.

SWANSON, J. M. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet*, v. 351, n. 9100, p. 429-33, Feb 1998.

VIGGIANO, D.; VALLONE, D.; SADILE, A. Dysfunctions in dopamine systems and ADHD: evidence from animals and modeling. *Neural Plast*, v. 11, n. 1-2, p. 97-114, 2004.

WEISS, M. D.; WEISS, J. R. A guide to the treatment of adults with ADHD. *J Clin Psychiatry*, v. 65 Suppl 3, p. 27-37, 2004.



World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders.  
*Int Classif.* 1992; 10: 1–267.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA NEUROBIOLOGY OF DISEASE

### GUIDE FOR AUTHORS

#### *Your Paper Your Way*

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

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

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

#### *Human and animal rights*

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

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

#### *Declaration of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

#### *Submission declaration and verification*

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

#### *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.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

#### **Copyright**

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

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

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

#### **Author rights**

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

#### **Role of the funding source**

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

### *Funding body agreements and policies*

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

### *Open access*

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### *Open access*

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

### *Subscription*

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

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

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

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

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

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

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

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### *Green open access*

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

This journal has an embargo period of 12 months.

### *Elsevier Publishing Campus*

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

### *Language (usage and editing services)*

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

### **Submission**

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.

### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### ***The Neuroscience Peer Review Consortium***

*Neurobiology of Disease* is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers.

It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neurobiology of Disease* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of *Neurobiology of Disease*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neurobiology of Disease*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neurobiology of Disease* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee

reports, reformat the paper to *Neurobiology of Disease* specification and submit the paper to *Neurobiology of Disease* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neurobiology of Disease*, and providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neurobiology of Disease* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

## **NEW SUBMISSIONS**

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

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

### *References*

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

### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

## **REVISED SUBMISSIONS**

### *Use of word processing software*

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

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

### ***Article structure***

#### *Subdivision - unnumbered sections*

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

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. 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.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***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. 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. **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.

### ***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  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  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 and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and 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). You can view example Highlights on our information site.

### ***Keywords***

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 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.

#### *Minimal Data Standards*

Resources reported in neuroscience articles often lack sufficient detail to enable reproducibility

or reuse. To facilitate resource identification in the neuroscience literature, we recommend to include relevant accession numbers and identifiers in your article, which will be converted into

links to corresponding data repositories and embedded enrichments once the article is published

and appears on SciencDirect. Please consider inclusion of GenBank accession numbers, antibody identifiers, species specific nomenclatures, and software identifiers in the method section of your article. The complete set of recommendations with detailed instructions is available at: <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/minimal-data-standards>

#### *Footnotes*

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

#### ***Artwork***

##### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

### *Formats*

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

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

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

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

### **Please do not:**

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

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

### *Illustration services*

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### *Figure captions*

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

### *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.

### *References*

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice

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

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

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

#### *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.

#### *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 and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/neurobiology-of-disease>

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

#### *Reference formatting*

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

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
  3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.

(2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

#### *Journal abbreviations source*

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

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific

research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products,

including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***Supplementary material***

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

### ***Database linking***

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article.

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

### ***Antibody data***

Antibody Data is the reference application linking to information about the antibodies mentioned in the article, based on the NIF Antibody Registry. Authors are encouraged to include relevant antibody identifiers in their articles (e.g. Antibody Registry: AB\_878537 or RRID: AB\_878537) if appropriate. More information.

### ***Interactive plots***

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

### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**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, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

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)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our Support Center.

**AFTER ACCEPTANCE*****Proofs***

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download the free Adobe Reader, version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online).

The exact system requirements are given at the Adobe site.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via email.

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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

***Offprints***

The corresponding author 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 Webshop. Corresponding authors who have published their article 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.