



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

NATHÁLIA KERSTING DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR MENSURAÇÃO DE IL-1 β EM
MODELO ANIMAL DE HEMORRAGIA DA MATRIZ
GERMINATIVA/INTRAVENTRICULAR PERINATAL**

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

NATHÁLIA KERSTING DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR MENSURAÇÃO DE IL-1 β EM
MODELO ANIMAL DE HEMORRAGIA DA MATRIZ
GERMINATIVA/INTRAVENTRICULAR PERINATAL**

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 obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre
DEZEMBRO/2013

"Todo o homem pode ser, se a isso se propuser, escultor do seu próprio cérebro" - Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, que, quando necessário, sempre se mostram solícitos a ajudar, sendo esta de todas as formas, desde um apoio, ou na parte que efetivamente envolvia o trabalho, com especial gratidão à Pamella e Gabriele.

Ao professor Dr. Jaderson da Costa, que aceitou mais uma orientação, dentre tantas outras atividades.

Ao grupo de meninas mais heterogêneo que já vi na vida, que chegaram como colegas de faculdade, ajudaram-me a construir esse sonho e que levarei para o resto da minha vida como amigas, Juliana, Laís, Laura, Thayssa e Vanessa

Aos demais colegas da turma sete do curso de Biomedicina que dividiram nestes quatro anos uma rotina pesada de estudos, noites mal dormidas, principalmente em vésperas das temidas provas finais, em que o *facebook* se transformava no maior site de desesperados do mundo, em especial à Mellanie e toda a sua generosidade, Alicia , minha eterna motivadora, Igor , meu querido amigo e exemplo de pesquisador, Djenifer, Sarah, Pâmela, Nicole, Édina, Carla, Giovana, Ethiane, Belisa enfim todos que se sintam parte desta história.

Às pessoas que me orientam há 22 anos, me dando sempre a liberdade sobre as minhas escolhas, mas sempre disponíveis com uma palavra de apoio, de motivação, ou um simples afago, minha avó Norma e madrinha Claudia.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MATRIZ GERMINATIVA SUBEPENDIMÁRIA	1
1.2 HEMORRAGIA DE MATRIZ GERMINAL/ INTRAVENTRICULAR PERINATAL	5
1.2.1 Epidemiologia	5
1.2.2 Etiologia da Lesão	6
1.2.3 Estadiamento.....	7
1.2.4 Hidrocefalia Pós-Hemorrágica e Leucomalácia Periventricular	7
1.2.4.1 Leucomalácia Periventricular Difusa	8
1.2.5 Citocinas Pró- Inflamatórias e a HMG/IV.....	9
1.2.6 Achados Clínicos	10
1.2.7 Diagnóstico	11
1.2.8 Metodologias Profiláticas e Tratamentos	12
1.3 MODELO ANIMAL EM HEMORRAGIA DE MATRIZ GERMINAL/ INTRAVENTRICULAR	13
2.OBJETIVO.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	14
3.TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	16
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
5.REFERÊNCIAS	30
6.ANEXO.....	35

SÍMBOLOS

EG: eminência gangliônica

FSC: fluxo sanguíneo cerebral

HMG/IV: Hemorragia de Matriz Germinal/ Intraventricular

HPIV: hemorragia peri-intraventricular

IG: idade gestacional

IL: interleucina

IL-6: interleucina 6

IL-1 β : interleucina 1 β

LPV: leucomalácia periventricular

MG: matriz germinal

Pro-IL-1 β : proteína precursor de Interleucina- 1 β

PC: paralisia cerebral

PDGF-B: Fator de crescimento derivado de plaquetas B

RN: recém-nascido

RM: ressonância magnética

S1P1: esfingosina-1- fosfato-1

TC: tomografia computadorizada

TGF- β : fator de crescimento transformante beta

UST: ultrassonografia transfontanelar

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1

ZG: zona germinal

RESUMO

A hemorragia da matriz germinativa/intraventricular (HMG/IV) é a complicação neurológica mais comum em recém-nascidos (RN) prematuros. A lesão tem origem partir de uma imaturidade da região da matriz germinativa subependimária, nicho de células precursoras neurais e gliais. A vulnerabilidade anatômica desta região, associada à imaturidade na autorregulação vascular, contribui para a suscetibilidade ao evento hemorrágico, com uma iminente lesão isquêmica secundária e desenvolvimento da Leucomalácia Periventricular. Quando essa lesão apresenta um caráter difuso, é observado um processo de apoptose, o qual está relacionado a atividade de citocinas pró- inflamatórias, como a IL-1 β . Descrita como um componente importante na inflamação em modelos de hemorragia e hipóxia, a IL-1 β possui relação com a atividade de outras citocinas, como a IL-6 e TNF- α , envolvidas na degeneração da mielina, apoptose oligodendrocítica, bem como na maturação dos precursores dos oligodendrócitos. O presente estudo tem como objetivo determinar a expressão cerebral da citocina pró-inflamatória de IL-1 β na inflamação decorrente da Hemorragia de Matriz Germinal/ Intraventricular induzida em modelo experimental neonatal. Ratos wistar machos de seis dias de vida (P6) foram separados randomicamente em grupo controle saudável e lesão (HMG/IV). O grupo lesão foi submetido à cirurgia esterotática com a injeção da enzima colagenase periventricularmente. Posteriormente, esses animais foram divididos em grupos de análise HMG/IV 1 dia e HMG/IV 3 dias, sacrificados e, a partir de homogeneizados do hemisfério lesado, foi mensurada a IL-1 β por ensaio in vitro imunoenzimático semi-quantitativo do tipo sanduíche (ELISA sandwich). Os resultados deste trabalho apresentaram valores estatisticamente aumentados do grupos de análise HMG/IV 1 dia e HMG/IV 3 dias, quando estes foram comparados aos do grupo controle. Logo, o modelo experimental, além de ser uma boa via de análise dos processos funcionais inerentes à lesão hemorrágica, também é uma boa opção para análises à nível molecular. Estes resultados são corroborados com análises clínicas, evidenciando o perfil translacional da pesquisa.

Lista de figuras:

Figura 1. A) Representação de uma secção coronal do hemisfério cerebral de um feto de 20 semanas. B) Desenho esquemático da barreira hematoencefálica da matriz germinal.....	1
Figura 2. A) Imunofluorescência de criosecção da matriz germinal de um pré-termo de 24 semanas com marcadores DAPI (azul), GFAP (verde) e CD34 (vermelho). B) Secção coronal duplamente marcada com doublecortina - para células precursoras neurais- e CD34- indicador de endotélio	2
Figura 3. O sistema venoso profundo de galeno, vista sagital.....	3
Figura 4. Fotomicrografia de um corte coronal de cérebro fetal ao nível da eminência gangliônica (EG) ao longo da parede do corno anterior do ventrículo lateral em determinadas idades gestacionais.....	4
Figura 5. Tabela com mecanismos patogênicos, supostos mecanismos e fatores de risco associados.....	5

1.INTRODUÇÃO

1.1 MATRIZ GERMINATIVA SUBEPENDIMÁRIA

A Matriz germinativa (MG) compreende não somente um sítio de proliferação neuronal, mas também o ponto de origem do tecido de sustentação cerebral. Anatomicamente, localiza-se ventro-lateralmente ao ventrículo lateral, entre o núcleo caudado e o tálamo, ao nível do forame de Monro (figura 1A). É constituída por uma população celular de metabolismo bastante ativo, tendo sua formação iniciada a partir da 12^a a 16^a semana de gestação, servindo como precursor neuronal por volta da 10^a a 20^a. No terceiro trimestre a matriz germinativa também possui sítios de origem de glioblastos, que serão posteriormente diferenciados em oligodendroglia e astrócitos. Entre as semanas 23 e 24, regride no sentido póstero-anterior, não sendo mais observada por volta da 36^a. Ressalta-se, ainda, sua composição gelatinosa, a qual contém uma rede vascular constituída de revestimento simples, com uma camada de endotélio, sem musculatura lisa, elastina ou colágeno (fig.1B) [1, 2].

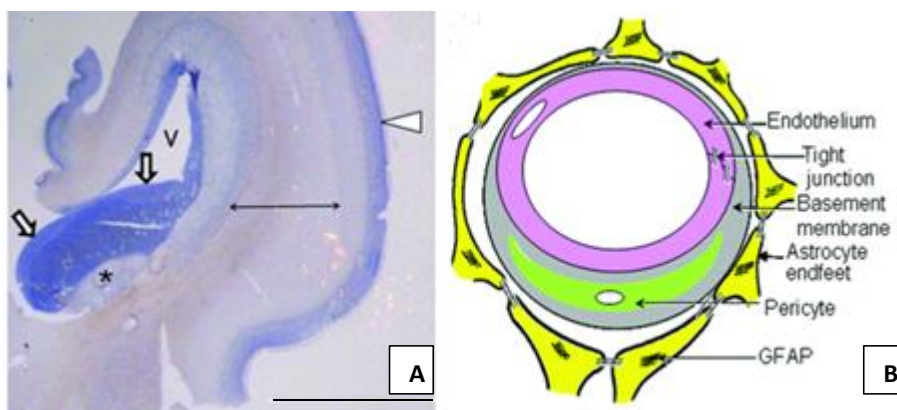


Figura 1. A) Representação de uma seção coronal do hemisfério cerebral direito de um feto de 20 semanas. Placa cortical (◁), substância branca (↔), matriz germinativa (setas), núcleo caudado (asterisco), ventrículo lateral (V). Barra de escala, 0,5 centímetros. B) Desenho esquemático da barreira hematoencefálica da matriz germinativa. Referências: modificado de Praveen Ballabh. *Pediatr Res.* 2010 January; 67(1): 1–8. Doi: 10.1203/PDR.0b013e3181c1b176.

Essa estrutura é mantida por junções de adesão (figura 1B), sendo compostas por três proteínas integrais de membrana, nomeadas claudina, ocludina e moléculas de junções de adesão, bem como por proteínas

citoplasmáticas de adesão - ZO1, ZO2, ZO3, cingulina e outras [3]. Moléculas de adesão celular, neste caso entre células endoteliais, contribuem para a integridade dos vasos sanguíneos, além de formar a barreira hematoencefálica para limitar a entrada de substâncias e moléculas para o interior dessa estrutura [4].

Alguns pontos, entretanto, configuram à matriz certa suscetibilidade a desequilíbrios hidrostáticos, como a ausência de fibronectina- proteína com importância na migração e adesão celular, além de interferir na organização do citoesqueleto [5]. Além disso, existe uma escassez de pericitos - células da microcirculação - capilares, vênulas e arteríolas - as quais envolvem as células endoteliais. Esses pericitos proporcionam a estabilidade e integridade estrutural à microvasculatura, estando envolvidos em diferentes estágios de angiogênese, reforçando o tecido de sustentação através da síntese de matriz extracelular e promovendo a diferenciação endotelial [6,7]. Para a plena realização deste processo, o recrutamento destas células envolve fatores cruciais, como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas-B (PDGF-B), angiopoetina-2 e esfingosina-1- fosfato-1 (S1P1) [8].

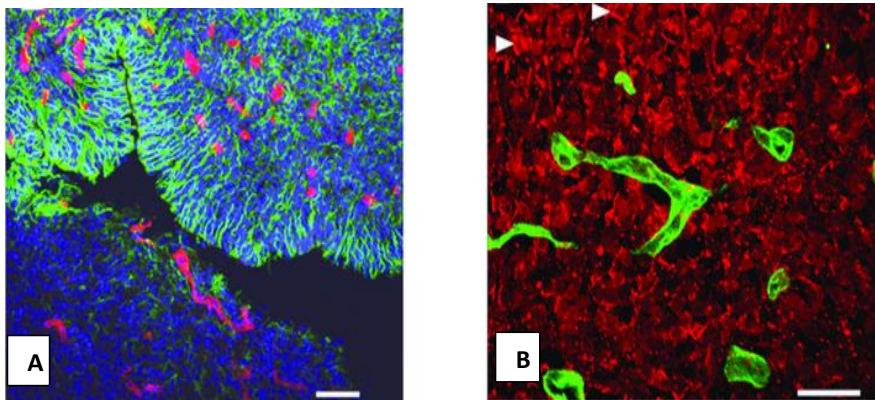


Figura 2. A) Imunofluorescência de criosecção da matriz germinal de um pré-termo de 24 semanas com marcadores DAPI (azul), GFAP (verde) e CD34 (vermelho). B) Secção coronal duplamente marcada com doublecortina - para células precursoras neurais- e CD34 - indicador de endotélio. Referência: modificado de Praveen Ballabh. *Pediatr Res.* 2010 January; 67(1): 1–8. Doi:10.1203/PDR.0b013e3181c1b176.

Quando comparada ao córtex, a irrigação dessa matriz é abundante, sendo realizada principalmente pela artéria de Heubner (ramo da artéria cerebral anterior) e pelas artérias estriadas laterais que se originam da artéria cerebral média. Estas artérias alimentam uma rede capilar constituída por vasos irregulares envoltos de endotélio que não têm características de arteríolas ou vênulas, um tecido vascular imaturo que se remodela a capilares definitivos, uma vez que a matriz germinativa desaparece (figura 2). O sistema venoso é constituído por três veias (coroidal, talâmica e tálamo-estriada), que formam a veia cerebral interna, convergindo próximo ao núcleo caudado à altura do forame de Monro. Essa veia dirige-se à grande veia de Galeno, estando propício à congestão venosa, sendo este o ponto onde o fluxo sanguíneo muda de trajeto, com posterior aumento da pressão da região (figura 3) [2, 9].

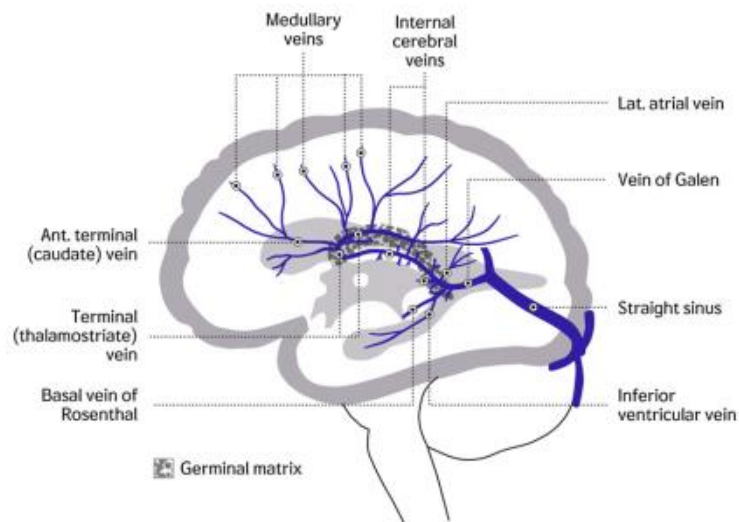


Figura 3. O sistema venoso profundo de galeno, vista sagital. Referência: Volpe JJ. Philadelphia: WB Saunders; 2008. p. 518.

Com o avançar da idade gestacional (IG) há aumento do peso cerebral, sendo relacionado ao número de neurônios, de células gliais, de vasos e ao desenvolvimento da arborização dendrítica e da mielina. Com a maturação em desenvolvimento, mudanças histológicas poderão ser notadas nesta área: a densidade e a variabilidade das células diminuem; ocorre a formação da mielina e os vasos amadurecem [10, 11, 12]. A partir

de experimentos de Del Bigio e colaboradores é possível a visualização desta maturação anatomovascular, relacionada ao um decréscimo na extensão da matriz, sendo observada, também, uma diminuição da proliferação celular [3] (Figura 4).

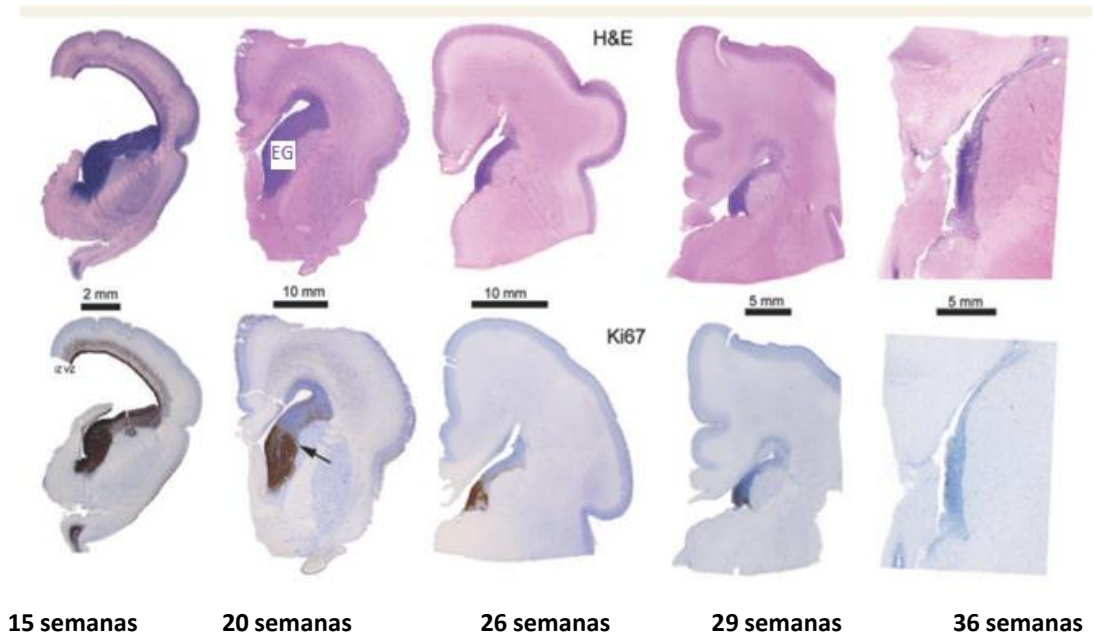


Figura 4. Fotomicrografia de um corte coronal de cérebro fetal ao nível da eminência gangliônica (EG) ao longo da parede do corno anterior do ventrículo lateral em determinadas idades gestacionais. Na primeira linha observa-se uma marcação com hematoxilina/ eosina. Na segunda linha, observa-se a marcação com Ki67, marcador de proliferação celular. Referência: Marc R. Del Bigio. Brain 2011: 134; 1344–1361.

1.2 HEMORRAGIA DE MATRIZ GERMINAL/ INTRAVENTRICULAR PERINATAL

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA

A hemorragia da matriz germinativa-intraventricular (HGM-IV) ocorre em 40-50% dos RNs com menos de 26 semanas e aproximadamente em 20% entre os RNs de 26-34 semanas de gestação. [13,14].

Nas unidades neonatais brasileiras, a incidência média em 1999 foi de 26%, variando de 13% a 46% nos recém-nascidos de muito baixo peso [15]. Nas unidades da Rede Gaúcha de Neonatologia, a incidência em 2006 foi de 21% (sendo 40,4% para hemorragia grau I, 16,8% para hemorragia grau II, 20,6% para hemorragia grau III e 22,1% hemorragia grau IV), dados obtidos da Rede Gaúcha de Neonatologia da Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul. Quando relacionado ao peso, o dado de mortalidade exposto apresenta uma percentagem de 84,1% com menos de 750 g; 55,8% entre 751-1000 g; 23% entre 1001-1250 g e 12,9% entre 1251-1500 g, o que indica o doença como um problema de saúde pública.

No entanto, devido aos avanços nas últimas décadas na assistência pré e perinatal houve uma redução na mortalidade. Estima-se que, na América Latina, a taxa de sobrevivência nos recém-nascidos com peso ao nascer abaixo de 1500 g é de 73% [16]. Esse resultado, portanto, direciona os estudos a outros índices significativos, os quais relacionam o insulto hemorrágico a sequelas motoras, em especial à hemiparesia espástica, e neurológicas severas, como a diminuição do número de axônios, dendritos, neurônios, mielina e sinapses, tendo como resultado a limitação do desenvolvimento destas crianças, através do prejuízo intelectual e desencadeamento de eventos convulsionantes, além do desenvolvimento de cegueira e surdez [17,18].

1.2.2 ETIOLOGIA DA LESÃO

A HMG/IV apresenta caráter multifatorial, podendo estar relacionada a fatores intravasculares como distúrbios plaquetários e de coagulação, hipotensão arterial com diminuição do fluxo sanguíneo cerebral seguido de reperfusão, aumento da pressão venosa cerebral (trabalho de parto, parto vaginal). Fatores vasculares como a fragilidade capilar, a vulnerabilidade dos capilares à lesão hipóxica-isquêmica; e avasculares – déficit no suporte vascular; atividade fibrinolítica anormal - podem também estar relacionados com o aparecimento do insulto [14,19]. Alguns estudos descritos na literatura ainda fazem uma referência ao peso dos RNs prematuros, relacionando o parâmetro ao evento hemorrágico. A hemorragia é considerada precoce se ocorre antes das 72 horas (h) de vida e tardia quando ocorre após este período [14].

Os fatores predisponentes à lesão podem, ainda, ser classificados a partir de três mecanismos patogênicos, conforme apresentado na figura 5: 1) distúrbios do fluxo sanguíneo cerebral, que incluem as variações na pressão cerebral venosa, bem como do próprio fluxo cerebral; 2) a fragilidade inerente à vasculatura da matriz germinal, que pode ser agravada por uma inflamação na barreira hematoencefálica; assim como 3) os distúrbios de coagulação e de plaquetas, que abarcam falhas hemostáticas.

Mecanismos patogênicos	Supostos mecanismos*	Fatores de risco
Distúrbios do Fluxo Sanguíneo Cerebral (FSC)	1. Flutuação do FSC	Hipóxia Hipercarbia Acidose severa Assincronia ventilatória Rápida infusão de NaHCO ₃
	2. Alta pressão cerebral venosa	Pneumotórax Alta pressão ventilatória Trabalho de parto prolongado e parto vaginal
	3. Pressão sanguínea anormal	Hipotensão Hipertensão Sepse Desidratação
	4. Pressão circulatória passiva	Extrema prematuridade e baixo peso (<1000g)
Fragilidade inerente da vasculatura da matriz germinativa	Pode ser agravada por lesão inflamatória na barreira hematoencefálica	Insulto hipóxico-isquêmico Sepse
Distúrbios de coagulação e de plaquetas	Falha hemostática	Trombocitopenia Coagulação intravascular disseminada

Figura 5. Tabela com mecanismos patogênicos, supostos mecanismos e fatores de risco 6 associados. Referência: Ballabh, P. *Pediatr Res* 2010; 67(1): 1–8.

1.2.3 ESTADIAMENTO

Duas possibilidades de estadiamento da doença foram descritos, sendo o primeiro por Papile et. al. (1978): O grau I equivale a uma hemorragia subependimária; grau II - hemorragia intraventricular sem dilatação ventricular lateral; grau III - hemorragia intraventricular com dilatação; grau IV - hemorragia intraventricular com hemorragia parenquimatosa [20]. A segunda possibilidade, descrita por Volpe et. al.(2003), relaciona o estadiamento a uma taxa de percentagem do conteúdo hemorrágico extravasado nos ventrículos laterais em cortes parasagital: hemorragia da matriz germinativa ou menos do que 10% de sangue; hemorragia intraventricular com 10-50% e hemorragia intraventricular com mais de 50% [10]. As regiões periventriculares dos hemisférios cerebrais são compostas pelo núcleo profundo e pelas fibras do centro semi-oval, sendo o desenvolvimento desta região importante para as conexões cerebrais e para o tamanho dos ventrículos. O sistema límbico, o sistema visual, o sistema auditivo, o motor primário e o sistema somatossensorial são todos dependentes da integridade destas conexões, e lesões que ocorrem nesta área cerebral do recém-nascido são geralmente destrutivas, havendo assim uma dilatação ventricular para compensar a perda tecidual [21].

1.2.4 HIDROCEFALIA PÓS-HEMORRÁGICA E LEUCOMALÁCIA PERIVENTRICULAR

A hidrocefalia pós-hemorrágica, relacionada a dilatação ventricular, podendo ser progressiva ou não, é um dos eventos que podemos considerar concomitante aos fenômenos de morte celular, dos quais se destaca primeiro a Leucomalácia Periventricular (LPV), subtipo de necrose neuronal [22]. Sua incidência varia conforme a gravidade da hemorragia e se torna

mais frequente com a diminuição da taxa de mortalidade dos RN prematuros de baixo peso. A maior sequela, a longo prazo, da LPV é a displegia espástica, o maior déficit motor no recém-nascido pré-termo, caracterizado por uma paresia espástica que afeta principalmente membros inferiores [10]. A evolução caracteriza-se por necrose de coagulação (5-8 h após a lesão). Após alguns dias, astrócitos, micróglia (24-48 h) e macrófagos (5 dias) enchem a periferia da necrose. O centro da área pode liquefazer, resultando em pequenas cavidades sem comunicação com os ventrículos (3 semanas). A necrose pode ser periventricular focal ou difusa na substância branca [20, 23].

1.2.4.1 Leucomalácia Periventricular Difusa

Este subtipo de leucomalácia se caracteriza por uma perda de oligodentrócitos, levando à deficiências na mielinização, com conseqüente diminuição do volume da substância branca, seguido de um aumento do tamanho ventricular [24]. A dilatação dos ventrículos é uma complicação frequente devido, possivelmente, ao comprometimento da reabsorção do líquido. Alguns estudos feitos a partir do líquido de crianças com o insulto mostram uma diminuição da atividade fibrinolítica, além de um aumento de fatores plaquetários (platelet-derived transforming growth factor b1– PDGF), bem como um aumento na expressão propeptídeo colágeno I C, desencadeando a formação de colágeno e a fibrose do espaço encéfalo raquidiano [25]. Quando ocorre dispersão da hemorragia no parênquima cerebral, envolvendo a substância branca periventricular, podemos ter o desenvolvimento de um cisto porencefálico no local da hemorragia. Alguns estudos apontam o infarto venoso como achado neuropatológico. A causa deste processo reside no fato de o hematoma da matriz germinativa causar uma obstrução no fluxo sanguíneo venoso, aumentando a pressão intraventricular e liberando substâncias vasoconstritoras no local, promovendo isquemia cerebral [26]. Estudos sugerem que este último

processo possa desencadear outra via de morte celular, a apoptose, a qual está relacionada diretamente a via inflamatória mediada por citocinas, sendo elas, em sua maioria, glicoproteínas. Quando pró-inflamatórias, essas citocinas desempenham um papel crucial na sinalização célula-célula induzindo a degeneração da mielina e a apoptose oligodendrócita. Essas moléculas podem exercer efeitos na maturação dos precursores dos oligodendrócitos, por meio da inibição da sua diferenciação, podendo levar, dessa forma, a hipomielinização no cérebro de recém-nascidos com lesão na substância branca [27,28,29].

1.2.5 CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS E A HMG/IV

As citocinas pró-inflamatórias mais descritas na literatura relacionadas à lesão hemorrágica são o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1- β (IL-1 β), moléculas indutoras do aumento da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), dentro do SNC, não só no parênquima, como também no endotélio vascular, comprometendo a ativação da micróglia e podendo levar à desmielinização [30]. A IL-1 β é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β), a qual não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1. A IL-1 β e o TNF- α são consideradas citocinas multifuncionais que podem desempenhar papéis importantes tanto em cérebros com desenvolvimento normal, assim como na resposta encefálica frente a diversas formas de lesão. Estas citocinas tem como característica a resposta rápida. Elas podem ser sintetizadas e secretadas por diversos tipos de células do sistema nervoso central, incluindo micróglia, os astrócitos e os neurônios, tendo interferência clara na modulação do desenvolvimento celular [31].

Logo, efeitos biológicos destas moléculas tem interferência tanto na progressão da lesão, como na regulação da cicatrização de feridas no cérebro. Outras ações incluem estimulação da síntese de outras citocinas,

como a IL-6, e mediadores de lesão solúveis, induzindo a infiltração leucocitária e estimulando da síntese local de fatores tróficos. Estudos obtidos em animais adultos sugerem que a IL-1 β contribui diretamente para a patogênese na lesão isquêmica cerebral [32,33,34]. Além disso, o tratamento com antagonista do receptor correspondente evidencia certa atenuação da lesão cerebral [35]. A IL-1 β é relatada em estudos utilizando modelos animais que mimetizam a hemorragia de matriz germinal por ação enzimática, sendo quantificadas não só no tecido encefálico, como também no tecido esplênico, mostrando que determinados insultos acarretam em uma mobilização sistêmica, principalmente em órgãos diretamente envolvidos na maturação imunológica [36, 37].

1.2.6 ACHADOS CLÍNICOS

O insulto primário hemorrágico tem como desdobramento outros processos, os quais caracterizam a injúria e podem ser relacionados aos achados clínicos. Entretanto, na maioria das vezes, o quadro é assintomático ou inespecífico e os sinais e sintomas dependem da velocidade de instalação da hemorragia, do tamanho, do local e de sua evolução. Os primeiros indícios clínicos podem acontecer como resultado da perda de volume sanguíneo ou da disfunção neurológica. Nenhum sinal é específico e depende em parte de quão rápida é a perda de sangue. Podem-se caracterizar três síndromes clínicas distintas [14]:

- Catastrófica: deterioração neurológica rápida, com índice de mortalidade elevado (50-60%) e sequelas graves a longo prazo nos sobreviventes. Sua evolução ocorre em minutos ou horas com estupor, coma profundo, hipoventilação ou apneia, convulsão generalizada tônica, rigidez pupilar, postura em descerebração, quadriparesia flácida e olhos fixos à estimulação vestibular. Os sinais clínicos são abaulamento da fontanela anterior, hipotensão, bradicardia, instabilidade térmica, acidose metabólica e alteração do controle glicêmico.

- Saltatória: hemorragias menos extensas, alternando períodos de normalidade com piora do quadro, instalando-se em horas ou dias. Ocorrem alterações no nível de consciência, hipotonia, alteração na posição e movimento dos olhos, diminuição da quantidade e qualidade da motricidade espontânea e ângulo poplíteo em extensão.
- Silenciosa: é diagnosticada por exames radiológicos de rotina. É a síndrome mais frequente, responsável por 50-60% dos sangramentos em RNs pré-termo menores de 1500 g. Os sinais são discretos e o achado clínico mais importante é a queda do hematócrito sem causa evidente.

1.2.7 DIAGNÓSTICO

A ultrassonografia transfontanelar (UST) é o método de escolha para o diagnóstico de hemorragia, pois apresenta baixo custo, boa sensibilidade e especificidade. A realização da UST deve ser feita nas primeiras 72 h de vida [10].

A tomografia computadorizada (TC) de crânio é eficaz para demonstrar o local e a extensão da hemorragia. De um modo geral, a TC é reservada para a identificação de outras variedades de hemorragias intracranianas, como o hematoma subdural e o epidural da fossa posterior e para elucidação de lesões parenquimatosas mais periféricas [14,10].

A ressonância magnética (RM) fornece excelentes imagens, mas é dispendiosa e requer o transporte do paciente para sua realização, o que torna a sua realização de rotina pouco viável em nosso meio. Esse procedimento é indicado nos casos de hemorragia grave e durante o acompanhamento neurológico do paciente na primeira infância [10].

Todo recém-nascido com IG igual ou menor de 32 semanas com peso de nascimento inferior a 1500 g deve ser submetido à UST nos primeiros 3-5 dias de vida, devendo o exame ser repetido com 7 dias de vida

e com um mês nos casos normais. Nos casos de alterações deve-se repetir semanalmente para diagnóstico da hidrocefalia pós-hemorragica [38].

1.2.8 METODOLOGIAS PROFILÁTICAS E TRATAMENTOS

Estratégias preventivas devem envolver os cuidados pré-natais e perinatais, com o objetivo de diminuir a mortalidade, além de aumentar a perspectiva de um diagnóstico precoce ou mesmo aplicação de tratamentos na iminência de prematuridade. Uma das estratégias usadas quando é previsto um parto prematuro é a administração de corticoides de forma endovenosa, apresentando-se eficaz em reduzir a incidência de hemorragia peri-intraventricular (HPIV) [39]. Esse procedimento parece acelerar a maturação da região da matriz germinativa, melhorando a perfusão cerebral em decorrência do aumento da pressão arterial sistêmica, tendo também relação com casos menos graves de doença da membrana hialina (DMH) [40]. Alguns estudos sugerem que o sulfato de magnésio administrado no período pré-natal possa diminuir o risco de paralisia cerebral (PC) e de HPIV. Seu mecanismo ainda não está totalmente elucidado, podendo ser devido a seus efeitos antioxidantes e ou vasculares (a inibição da síntese do óxido nítrico diminui a formação de radicais livres na isquemia neuronal. No entanto, esta inibição pode comprometer as funções vaso-regulatórias mediadas pelo óxido nítrico, levando a distúrbios na resposta à hipoxemia) [40].

1.3 MODELO ANIMAL EM HEMORRAGIA DE MATRIZ GERMINAL / INTRAVENTRICULAR

A patogênese da hemorragia de matriz germinal / intraventricular tem uma variedade de fatores desencadeadores, sendo estes intrínsecos ou extrínsecos. Além disso, os desdobramentos do insulto podem acarretar em comorbidades, as quais são evidenciadas a partir das correlações clínicas, levando a um dos graus na classificação do estadiamento da lesão primária. Portanto, a construção de um modelo experimental ocorre de uma forma gradual e direcionada a umas destas vias de desencadeamento da injúria. Os primeiros estudos para indução de HGM/IV tinham como metodologia injeção de sangue autólogo dentro da região periventricular do cérebro de ratos no primeiro dia de vida. Quando os animais eram submetidos a exames de ressonância magnética e histologia, observava-se também anormalidades no comportamento, sendo um modelo razoável de paralisia cerebral, utilizado até hoje [41]. No entanto, esta metodologia traz outros interferentes ao experimento, podendo, por exemplo, induzir uma mobilização imunológica não similar à lesão, por meio de uma interação celular diversa e também a síntese de fatores inerentes, bem como a própria ativação fisiológica da via de coagulação podendo ser desencadeadora de um distúrbio no fluxo do líquido encéfalo raquidiano. Assim, não se trata, primeiramente, de uma fragilidade da matriz germinal, ou mesmo de uma distúrbios vasculares que, combinados a esta fisiologia, levam a um quadro de hemorragia. Outros estudos apresentaram um modelo de hemorragia na região do estriado em camundongos RN, com 10 dias de vida e adultos. Estes fizeram comparações injetando solução salina, sangue autólogo, trombina e plasminogênio e demonstraram que o dano cerebral no camundongo RN foi pior que com 10 dias de vida e no adulto. Em resumo: esses resultados demonstram que a injeção de sangue, trombina e plasminogênio, no cérebro de ratos, está associada com uma morte celular e bem como, à inflamação, todavia o grau desta lesão é associado a idade, e; portanto, a uma outra organização encefálica [42].

A hemorragia intracraniana também pode se dar através de injeção de collagenase bacteriana (tipo IV, VII, IX) dentro do núcleo da base do cérebro. Collagenases são enzimas muito específicas que clivam ligações peptídicas nas regiões de hélice tríplice do colágeno presente na lâmina basal dos vasos sanguíneos e causa sangramento no tecido cerebral produzindo extravasamento de eritrócitos e originando um sólido hematoma. O modelo foi primeiramente introduzido em experimento com ratos adultos [43]. O tamanho final do hematoma foi diretamente proporcional à quantidade de collagenase administrada. Del Bigio e colaboradores também demonstraram que a collagenase causa significantes reações inflamatórias e outros prováveis mecanismos, que então produzem hemorragia intracraniana em humanos. Observa-se edema até no máximo 24 h após indução, permanecendo por dias e causando deterioração da função neurológica [43, 44, 45]. A reação inflamatória com a collagenase ocorre de forma precoce, tornando-se mais prolongada quando comparada a outros modelos de hemorragia. Este prolongamento, portanto, torna o modelo mais eficaz na análise da patogênese, uma vez que a lesão tem como característica a progressividade, a qual é evidenciada pela manutenção de repostas inflamatórias de fase aguda em um período cronologicamente mais distante do desencadeamento do insulto.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β em modelo experimental de HMG/IV neonatal.

2.1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Mensurar níveis de IL-1 β em homogeneizado do hemisfério cerebral direito de animais neonatos submetidos ao modelo de HMG/IV 1 e 3 dias

após insulto hemorrágico pelo método imunoenzimático semi-quantitativo do tipo sanduíche (ELISA sandwich).

3. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Formatado de acordo com as normas do periódico Brain
Research

AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO POR MENSURAÇÃO DE IL-1 β EM MODELO ANIMAL DE HEMORRAGIA DA MATRIZ GERMINATIVA/INTRAVENTRICULAR PERINATAL

Nathália Kersting dos Santos^{a,b}, Pamella Nunes Azevedo^b,
Gabriele Zaniratti^b, Jaderson Costa da Costa^b

^a Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do
Sul, Brasil

^b Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, Instituto de Pesquisas
Biomédicas, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do
Sul, Brasil.

Resumo

A hemorragia da matriz germinativa/intraventricular (HMG/IV) é a complicação neurológica mais comum dos recém-nascidos (RNs), acometendo cerca de 50% dos nascidos prematuros com menos de 34 semanas gestacionais ou com peso abaixo de 1500g. Estatísticas sugerem que a patogênese, atingindo grau de moderado a severo, predispõe os RN a eventos como hidrocefalia pós-hemorragica, hemiplegia, epilepsia, paralisia cerebral e retardo mental, enquanto os acometidos por lesão de grau leve apresentam risco de deficiências do desenvolvimento. O tratamento da HMG/IV resume-se a medidas de suporte e não se dirige à restauração do processo de lesão cerebral neonatal. A Leucomalácia Periventricular - lesão de substância branca - é uma patogênese secundária à hemorragia, podendo ser restrita ou difusa. Estudos sugerem ser característico desta última uma via apoptótica que tem relação com a atividade de interleucinas (ILs) pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α). O objetivo do estudo se dá na avaliação dos níveis de (IL-1 β) em ratos Wistar machos de seis dias de vida (P6) a partir da indução de HMG/IV pela injeção da enzima colagenase periventricularmente. A mensuração dos níveis de IL-1 β foi feita a partir de ensaio in vitro imunoenzimático semi-quantitativo (ELISA) 1 e 3 dias após a indução da lesão(HMG/IV 1d e HMG/IV 3d, respectivamente). Os resultados evidenciam níveis significativos estatisticamente nos grupos de análise HMG1d e HMG3d, quando comparados ao grupo controle. Logo, sugere-se a participação da IL-1 β no processo inflamatório da HMG/IV, resultado que é corroborado por ensaios clínicos; mostrando que o modelo animal também tem eficácia em relação aos parâmetros celulares da patogenia.

Highlights: Modelo animal de Hemorragia de Matriz Germinal; Mensuração de IL-1 β , modelo com injeção de colagenase causa o aumento dos níveis de IL-1 β .

Palavras-chaves: Hemorragia de Matriz Germinal / Intraventricular; Leucomalácia Periventricular; Inflamação; Apoptose; Interleucina- 1 β .

1. INTRODUÇÃO

A hemorragia de matriz germinal subependimária /intraventricular (HMG/IV) é o tipo mais comum de insulto hemorrágico intra-periventricular, acometendo recém-nascidos pré-termos (Berger, Bender et al. 1997,

Kopelman B NdSA 2004). A injúria pode ser caracterizada como uma lesão primária, que ocorre a partir de uma fragilidade do sistema venoso da matriz, ou como um processo secundário, tendo um espectro de processos patogênicos amplo. Neste, estão incluídos a flutuação do fluxo sanguíneo cerebral - relacionados a eventos a hipóxia - além de alterações na pressão sanguínea - decorrente de processos como a sepse, hipotensão e hipertensão - sendo relacionado também a distúrbios na pressão venosa - principalmente em situações de trabalho de parto prolongado. Logo, atribui-se à doença um caráter multifatorial, com causas vasculares e extravasculares (Kopelman B NdSA 2004, Xue, Balasubramaniam et al. 2006, Ballabh 2010).

A leucomalácia periventricular (LPV) é um tipo de necrose neuronal da substância branca também decorrente do insulto hemorrágico, podendo ser classificada como focal ou difusa (Volpe 1997). Inicialmente, ocorre a formação de uma necrose de coagulação (5-8 h após a lesão), seguida de um preenchimento periférico por astrócitos, micróglia (24-48 h) e macrófagos (5 dias). O centro da área necrótica pode liquefazer, resultando em pequenas cavidades sem comunicação com os ventrículos (3 semanas). Na lesão difusa, há perda de oligodentrócitos com substituição por astrócitos, levando à deficiente mielinização (Margotto 2004)(Papile, Burstein et al. 1978, Khwaja and Volpe 2008). A dilatação dos ventrículos é uma complicação frequente devido, provavelmente, ao comprometimento da reabsorção do líquido, em função da obstrução dos forames de Luschka e Magendie (Ghazi-Birry, Brown et al. 1997). Quando a hemorragia se estende ao parênquima cerebral, levando ao dano da substância branca periventricular, ocorre a formação de um hematoma, o qual pode ser substituído por formações císticas cerebrais, que levam à destruição de precursores gliais e danos para o cérebro em desenvolvimento (Volpe 2001). A hemorragia pode permanecer circunscrita a este nível ou drenar para as cavidades ventriculares. Alguns estudos ressaltam a existência de um infarto venoso secundário, o qual poderia ter como causa o hematoma da matriz germinativa. Este faria uma obstrução ao fluxo sanguíneo venoso, e a pressão intraventricular elevada liberaria substâncias vasoconstritoras no

local, ambas situações promovendo isquemia cerebral, caracterizada pela diminuição da perfusão sanguínea (Volpe 2003).

A inflamação cerebral é caracterizada pela infiltração de células do sistema imunológico e pela ativação de células residentes, incluindo a micróglia (Leviton, Allred et al. 2012). A isquemia cerebral, secundária ao evento hemorrágico, está intimamente relacionada a este processo, uma vez que desencadeia a migração e a ativação destas células e de outros mediadores. Sendo assim, está envolvida com o processo de morte celular programada, o qual tem relação com a síntese de glicoproteínas denominadas interleucinas (Elsmen, Ley et al. 2006, Bassan 2009). No contexto da lesão hemorrágica, estudos destacam a relevância do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina 6 (IL-6), e, principalmente, da interleucina 1 β (IL-1 β). Esta é indutora da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), dentro do sistema nervoso central (SNC), tanto no parênquima como no endotélio vascular, podendo interferir na ativação da microglia e levar à desmielinização (Kadhim, Tabarki et al. 2001). Em estudos clínicos foram mensurados três componentes da família da interleucina 1 (IL-1) a partir do líquido cérebro-espinhal de recém-nascidos diagnosticados com hidrocefalia pós-hemorrágica, destacando-se um aumento nos níveis da IL-1 β (Savman, Blennow et al. 2002, Schmitz, Heep et al. 2007).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é quantificar em dois diferentes tempos a IL-1 β , com o intuito de avaliar o seu comportamento em um período precoce à lesão, podendo assim determinar a sua importância no insulto hemorrágico mimetizado em modelo experimental.

2. RESULTADOS

2.1 Citocina pró-inflamatória IL-1 β tem sua expressão aumentada em modelo animal neonatal de HMG/IV

Os níveis de IL-1 β avaliados pelo ELISA sandwich a partir do hemisfério direito de animais previamente submetidos a HMG/IV (figura 1A) encontravam-se significativamente aumentados, tanto 1 (um) quanto 3 (três) dias após o insulto hemorrágico (HMG/IV 1d 1208 \pm 145 pg/mg); (HMG/IV 3d 1311 \pm 51pg/mg) quando comparados ao grupo controle sadio (472 \pm 75 pg/mg). Não foi observado diferença entre os tempos de análise do grupo HMG. Para a análise foi considerado significativo $p < 0,05$.

3. DISCUSSÃO

A investigação acerca de qualquer patogenia por meio de modelo animal tem como objetivo o entendimento de processos inerentes a esta, os quais podem se manifestar de forma funcional, ou mesmo a nível celular e molecular. A Hemorragia de Matriz Germinal - Intraventricular (HMG/IV) tem como estrutura uma sucessão de processos patogênicos que estão intimamente ligados ao seu grau de severidade e, portanto, ao seu diagnóstico clínico (Papile, Burstein et al. 1978). A literatura sugere que dois processos podem ser observados de forma simultânea, em nível celular, a Leucomalácia Periventricular (LPV) e, em escala semiológica (clínica), a Hidrocefalia ventricular pós-hemorrágica (HVPH) (Volpe 1997, Strahle, Garton et al. 2012). Além disso ambos processos são concomitantes e associados ao evento inflamatório (Lekic, Manaenko et al. 2011).

Da mesma forma que, a partir de nossos resultados, foi possível evidenciar uma mensuração significativamente alta da interleucina pró-inflamatória IL-1 β em tecido encefálico de ratos em idade neonatal, outras pesquisas evidenciam o mesmo biomarcador inflamatório, em nível clínico ou pré-clínico, a partir de outros tipos de amostra para mesma lesão

hemorrágica. Sävman e colaboradores associaram uma resposta inflamatória, por meio da expressão de citocinas em fluido cérebro - espinal de recém-nascidos prematuros, ao quadro de HVPH obtendo dados consideráveis, estando dentre estes a mensuração da IL-1 β . No entanto, o estudo não conseguiu fazer uma correlação direta destes resultados ao evento hemorrágico, tampouco à severidade da lesão. Foi sugerido pelo grupo que a causa desta não correlação se deu porque a coleta foi feita duas semanas após o evento hemorrágico (Savman, Blennow et al. 2002). O mesmo estudo, todavia sugere que a o processo inflamatório da HMG tenha relação com a expressão da IL-1 β . Schmitz e colaboradores também fizeram análise a partir da coleta de fluido cérebro- espinal, no entanto foi estabelecido uma análise temporal do estudo com a coleta de duas amostras de pacientes diagnosticados com HMG e HVPH com e sem lesão de substância branca. Os dados apontaram que, em escala aguda, houve grau de significância na mensuração de IL-1 β em ambos grupos, não sendo observado o mesmo resultado em amostras tardias ao evento hemorrágico. É de relevância ressaltar, no entanto, que análises feitas com interferon-gama - membro da mesma família da IL-1 β , mostraram uma significância em paciente com lesão de substância branca - supostamente inerente ao processo hemorrágico - em período tardio (Schmitz, Heep et al. 2007).

Logo estes resultados corroboram com a análise feita em modelo animal do presente estudo, mostrando que o desencadeamento da inflamação no contexto hemorrágico pode ter relação com a expressão aguda da IL-1 β , a qual tem como caráter biológico ser uma molécula de resposta rápida (Kadhim, Tabarki et al. 2001). Outros fatores, que nos levam a acreditar na expressão precoce da IL-1 β , levam em consideração que a patogenia da lesão, descrita em literatura, relata uma ativação microglial (Keep, Hua et al. 2012). Esta já poderia interferir na expressão da interleucina, além de haver uma infiltração leucocitária, sendo de importância a possível associação entre a IL-1 β a expressão de proteínas de adesão celular como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (Kadhim, Tabarki et al. 2001). No entanto, nossos resultados não podem sugerir, ainda, que o perfil de expressão da IL-1 β , no modelo animal de HMG/IV,

tende a decrescer em fase crônica, nem mesmo a sua relação com suposta lesão de substância branca, sendo necessário análises complementares.

Em relação a análises de amostras periféricas à lesão, Ambalavanan, N. e colaboradores demonstraram resultados não clinicamente significativos quando da mensuração de interleucinas, dentre elas a IL-1 β , em sangue periférico de recém-nascidos que sofreram o insulto hemorrágico (Ambalavanan, Carlo et al. 2012). Portanto, questiona-se, além de questões temporais, a origem da amostra a ser analisada.

Os presentes resultados, portanto, configuram o modelo experimental, com a injeção periventricular de colagenase, em ratos de seis dias de vida como um bom método para a investigação do processo inflamatório que acomete os pacientes neonatais diagnosticados com HMG/IV, sendo a IL-1 β um bom biomarcador agudo da lesão hemorrágica, uma vez que os resultados corroboraram com análises em nível clínico (Schmitz et al. 2007)

4. Conclusões

O estudo em questão demonstrou a expressão aumentada da citocina pró-inflamatória IL-1 β em modelo animal de Hemorragia de Matriz Germinal /Intraventricular sendo, portanto, um bom biomarcador. No entanto, estudos adicionais devem ser feitos a fim de investigar o perfil da interleucina ao longo da patogênese, bem como a relação desta com a severidade da lesão.

5. Material e Métodos

5.1 Animais

Ratas Wistar prenhas foram mantidas no alojamento para animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUCRS), onde permaneceram em ambiente climatizado

($21 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 em 12 h, com água e ração *ad libitum*. O dia do nascimento dos animais foi registrado e foi dado como o dia pós-natal 1 (P1).

5.2 Aspectos éticos

Este estudo seguiu os protocolos experimentais conforme normas internacionais e nacionais de experimentação com animais de laboratório. Estes receberam cuidados adequados, tendo sido submetidos ao mínimo de desconforto possível e de estresse, somado, com o menor número de animais utilizados para se obter uma diferença estatística significativa. Em todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos, houve sedação e analgesia de acordo com a necessidade, para evitar qualquer sofrimento. Neste estudo foram usados animais cedidos pelo projeto “Efeito do Transplante de Células-Tronco do Sangue de cordão Umbilical Humano no Tratamento de ratos Neonatos Submetidos ao Modelo de Hemorragia da Matriz Germinativa/Intraventricular”, aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da instituição, sob registro número 12/00298.

5.3 Modelo Experimental

O modelo de indução de Hemorragia de Matriz Germinal/Intraventricular foi baseado em estudos desenvolvidos por Alles e colaboradores e Lekic e colaboradores (Alles, Greggio et al. 2010, Lekic, Manaenko et al. 2012), mostrando que a indução nesta idade acarreta em características semelhantes aos achados clínico-patológicos. Um número de 12 Ratos Wistar machos foram divididos randomicamente em dois grupos experimentais: Controle (n=4) e HMG/IV (n=8). Neste último grupo os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5% a 2% isoflurano; 70x30 de N₂O/O₂) e fixados em um aparelho estereotáxico com a temperatura corporal mantida. Uma incisão mediana foi realizada no escalpo a fim de deixar as suturas cranianas expostas. Posteriormente, as seguintes coordenadas estereotáxicas foram precisamente medidas a partir do bregma: antero-

posterior (AP) -1,8mm, medio-lateral (MD) -1,5mm e dorso-ventral (DV) -2,8mm. No local uma pequena trepanação utilizando uma broca odontológica foi realizada. A infusão de 0,3U de colagenase bacteriana (Tipo VII, Sigma Chemical Co; 3U/1 μ l NaCl) foi realizada por uma agulha de 27G acoplada a uma seringa Hamilton (10 μ l) na região periventricular direita dos animais em velocidade constante (0,5 μ l/min) com o auxílio de uma bomba de infusão (KDS2000, KD Scientific). A agulha foi mantida no local por um tempo adicional de 5 min a fim de evitar refluxo da enzima e permitir sua total dispersão. Após, a incisão foi suturada com fio de seda 7.0. Ao término do procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em ambiente pós-operatório aquecido até a recuperação completa da anestesia e então devolvidos as mães. O grupo controle foi apenas anestesiado.

5.4 Mensuração da IL-1 β para ensaio imunoenzimático (ELISA)

A mensuração dos níveis de IL-1 β foi realizada a partir de homogeneizados do hemisfério lesado direito dos animais submetidos ao modelo de HMG/IV através do ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (Rat IL-1 β Standard ELISA Development Kit- Peptotech®). Os procedimentos experimentais seguiram as instruções do fabricante.

Os animais foram eutanasiados por decaptação 1 e 3 dias pós-insulto hemorrágico. Seus encéfalos foram removidos e o hemisfério direito foi armazenado a -80°C para posterior análise.

As amostras foram, primeiramente maceradas e homogeneizadas em tampão de lise (Tris-HCl (20 mM) (pH 7.4); NaCl(137mM); EGTA (1 mM); EDTA (1 mM); Na₃VO₄(1 mM); NaF(50mM); Nonidet P-40(1%); inibidor de protease(10x)). Posteriormente, passaram pelo processo de sonicação e centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados para o ensaio. A montagem da placa de análise foi feita a partir da incubação desta com anticorpo primário *overnight*, seguida da construção da curva padrão de concentrações, com intervalo estabelecido pelo fabricante do kit. A análise

semi-quantitativa foi feita respeitando um comprimento de onda de 405nm com correção para 650nm. Os resultados finais foram expressos em pg/mg.

5.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados a partir do cálculo das médias das duplicatas, sendo utilizada como metodologia o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, considerando $p < 0,05$.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Alles, Y. C., S. Greggio, R. M. Alles, P. N. Azevedo, L. L. Xavier and J. C. DaCosta (2010). "A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage." Brain Res **1356**: 130-138.
- Ambalavanan, N., W. A. Carlo, S. A. McDonald, A. Das, D. E. Schendel, P. Thorsen, D. M. Hougaard, K. Skogstrand and R. D. Higgins (2012). "Cytokines and posthemorrhagic ventricular dilation in premature infants." Am J Perinatol **29**(9): 731-740.
- Ballabh, P. (2010). "Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease." Pediatr Res **67**(1): 1-8.
- Bassan, H. (2009). "Intracranial hemorrhage in the preterm infant: understanding it, preventing it." Clin Perinatol **36**(4): 737-762, v.

Berger, R., S. Bender, S. Sefkow, V. Klingmuller, W. Kunzel and A. Jensen (1997). "Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **75**(2): 191-203.

Elsmen, E., D. Ley, C. M. Cilio, I. Hansen-Pupp and L. Hellstrom-Westas (2006). "Umbilical cord levels of interleukin-1 receptor antagonist and neonatal outcome." Biol Neonate **89**(4): 220-226.

Ghazi-Birry, H. S., W. R. Brown, D. M. Moody, V. R. Challa, S. M. Block and D. M. Reboussin (1997). "Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics." AJNR Am J Neuroradiol **18**(2): 219-229.

Kadhim, H., B. Tabarki, G. Verellen, C. De Prez, A. M. Rona and G. Sebire (2001). "Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia." Neurology **56**(10): 1278-1284.

Keep, R. F., Y. Hua and G. Xi (2012). "Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets." Lancet Neurol **11**(8): 720-731.

Khwaja, O. and J. J. Volpe (2008). "Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **93**(2): F153-161.

Kopelman B NdSA, G. A., et al. (2004). Diagnóstico e tratamento em neonatologia.

Lekic, T., A. Manaenko, W. Rolland, P. R. Krafft, R. Peters, R. E. Hartman, O. Altay, J. Tang and J. H. Zhang (2012). "Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus." Exp Neurol **236**(1): 69-78.

Lekic, T., A. Manaenko, W. Rolland, J. Tang and J. H. Zhang (2011). "A novel preclinical model of germinal matrix hemorrhage using neonatal rats." Acta Neurochir Suppl **111**: 55-60.

Leviton, A., E. N. Allred, O. Dammann, S. Engelke, R. N. Fichorova, D. Hirtz, K. C. Kuban, L. R. Ment, M. O'Shea T, N. Paneth, B. Shah and M. D. Schreiber (2012). "Systemic Inflammation, Intraventricular Hemorrhage, and White Matter Injury." J Child Neurol.

Margotto (2004). Assistência ao Recém Nascido de Risco.

Papile, L.-A., J. Burstein, R. Burstein and H. Koffler (1978). "Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of

infants with birth weights less than 1,500 gm." The Journal of Pediatrics **92**(4): 529-534.

Papile, L. A., J. Burstein, R. Burstein and H. Koffler (1978). "Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm." J Pediatr **92**(4): 529-534.

Savman, K., M. Blennow, H. Hagberg, E. Tarkowski, M. Thoresen and A. Whitelaw (2002). "Cytokine response in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthaemorrhagic ventricular dilatation." Acta Paediatr **91**(12): 1357-1363.

Schmitz, T., A. Heep, F. Groenendaal, D. Huseman, S. Kie, P. Bartmann, M. Obladen and U. Felderhoff-Muser (2007). "Interleukin-1beta, interleukin-18, and interferon-gamma expression in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus--markers of white matter damage?" Pediatr Res **61**(6): 722-726.

Strahle, J., H. J. Garton, C. O. Maher, K. M. Muraszko, R. F. Keep and G. Xi (2012). "Mechanisms of Hydrocephalus after Neonatal and Adult Intraventricular Hemorrhage." Transl Stroke Res **3**(Suppl 1): 25-38.

Volpe, J. J. (1997). "Brain injury in the premature infant. Neuropathology, clinical aspects, pathogenesis, and prevention." Clin Perinatol **24**(3): 567-587.

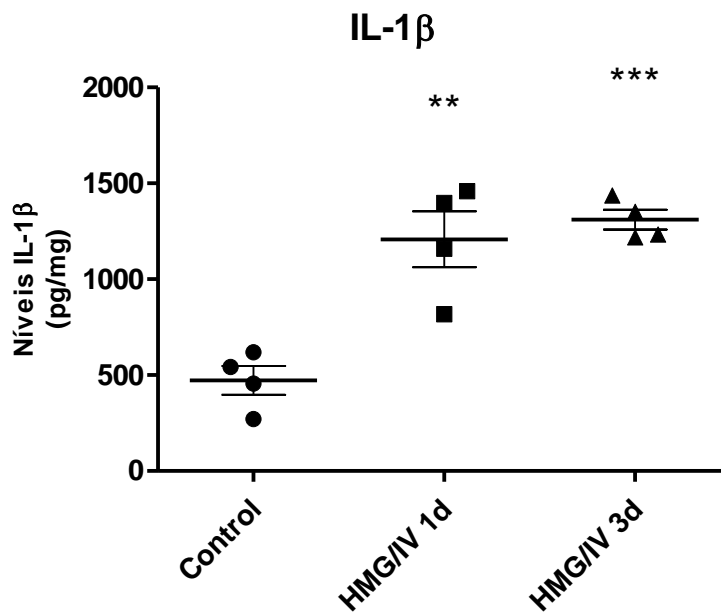
Volpe, J. J. (2001). "Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **7**(1): 56-64.

Volpe, J. J. (2003). "Cerebral white matter injury of the premature infant--more common than you think." Pediatrics: 176-180.

Xue, M., J. Balasubramaniam, K. A. L. Parsons, I. W. McIntyre, J. Peeling and M. R. Bigio (2006). "Does Thrombin Play a Role in the Pathogenesis of Brain Damage After Periventricular Hemorrhage?" Brain Pathology **15**(3): 241-249.

Figura 1. A) Mensuração de IL-1 β em Modelo Animal de Hemorragia de Matriz Germinal/ Intraventricular. Grupo controle (branco); grupo HMG/IV 1d (preto) e HMG/IV 3d (cinza).

A



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Hemorragia de Matriz Germinal/Intraventricular (HMG/IV), portanto, trata-se de um processo patogênico, cujas etapas, embora não ocorram em uma linearidade, podem ser investigadas a partir de metodologias que tenham como base as análises *in vivo* e *in vitro* combinadas. A construção de um modelo animal leva em consideração uma aproximação da neurofisiologia do animal àquela idade com o quadro que a clínica nos apresenta. Dentro deste, além de fatores funcionais, o diagnóstico laboratorial busca um conjunto de fatores que levem a corroborar com o pré-laudo.

A presente monografia evidenciou um aumento na mensuração do biomarcador imunológico Interleucina 1 β em modelo neonatal da HMG/IV, em fase aguda, corroborando com resultados da clínica, não sendo ainda possível afirmar a sua sensibilidade quanto a severidade da lesão, bem como seu perfil em fase crônica.

5. REFERÊNCIAS

1. Szymonowicz W, Schafner K, Cussen LJ, Yu VY. Ultrasound and necropsy study of periventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child*. 1984 Jul; 59(7):637–642.
2. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev. Disabil Res Rev* 2001;7(1):56-64.
3. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16:1–13.
4. Ballabh P, Hu F, Kumarasiri M, Braun A, Nedergaard M. Development of tight junction molecules in blood vessels of germinal matrix, cerebral cortex, and white matter. *Pediatr Res* 2005; 58:791–798.
5. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 2005; 24:389–399.
6. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 1998; 53:637–644.
7. Hirsch KK, D'Amore PA. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* 1997; 79:419–428.
8. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685–693.
9. Carvalho MF SV. *Cuidados Intensivos no Período Neonatal*. Ed. Savier Ed. São Paulo 1999.
10. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 4ª edição Ed. Saunders. W, editor. Philadelphia 2000.
11. Burstein J, Papile LA, Burstein R. Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in premature newborns: a prospective study with CT. *AJR Am J Roentgenol*. 1979 Apr;132 (4):631-5

12. Cherian SS, Love S, Silver IA, Porter HJ, Whitelaw AG, Thoresen M. Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Mar; 62(3):292-303.

13. Berger R, Bender S, Sefkow S, Klingmuller V, Kunzel W, Jensen A. Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997 Dec; 75(2):191-203.

14. Kopelman B, NdSA, Goulart A, et al. Diagnóstico e tratamento em neonatologia. Atheneu, editor. São Paulo. 2004.

15. Leone CS, LSR; Vaz, FC et al. Brazilian Neonatal Research Network very low birth weight infant morbidity and mortality. *Pediatr res* 2001;49:405 A

16. Tapia JC, J. Very-low birth weight infant outcomes in 11 South American NICUs. *J Perinatol* 2002; 22:2.

17. Stathis SL, O'Callaghan M, Harvey J, Rogers Y. Head circumference in ELBW babies is associated with learning difficulties and cognition but not ADHD in the school-aged child. *Dev Med Child Neurol* 1999 Jun; 41(6):375-80.

18. Hack M, Taylor HG. Perinatal brain injury in preterm infants and later neurobehavioral function. *Jama* 2000 Oct 18; 284(15):1973-4.

19. Xue M, Balasubramaniam J, Parsons KA, McIntyre IW, Peeling J, Del Bigio MR. Does thrombin play a role in the pathogenesis of brain damage after periventricular hemorrhage? *Brain Pathol* 2005 Jul; 15(3):241-9.

20. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr* 1978 Apr; 92(4):529-34.

21. Larroque B, Marret S, Ancel PY, Arnaud C, Marpeau L, Supernant K, et al. White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EPIPAGE study. *J Pediatr* 2003 Oct; 143(4):477-83.

22. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant. Neuropathology, clinical aspects, pathogenesis, and prevention. *Clin Perinatol* 1997 Sep; 24(3):567-87.

23. Margotto P. Assitência ao Recém-nascido de Risco. ed. Pórfiro ed. Brasília 2004.

24. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008 Mar; 93(2):F153-61.

25. Goddard-Finegold J, Mizrahi EM. Intracranial Hemorrhage in the Preterm Infant: Understanding It Preventing It. *J Child Neurol*. 1987 Jul; 2(3):170-85.

26. Volpe JJ. Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think. *Pediatrics* 2003 Jul; 112(1 Pt 1):176-80.

27. Dammann O, Leviton A. Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006 Oct; 11(5):363-8.

28. Dammann O, Leviton A. Placental cytokine expression in preterm labour and the fetal inflammatory response. *Cytokine* 2000 Feb; 12(2):176-7.

29. Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol* 2008 Dec; 35(4):643-63, v.

30. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001 May 22; 56(10):1278-84.

31. Bassan, H. "Intracranial Hemorrhage in the Preterm Infant: Understanding It, Preventing It." *Clinics in perinatology* . (2009) 36(4): 737-762

32. Amantea, Diana. Identification of distinct cellular pools of interleukin-1 β during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat. *Brain research* [0006-8993]. 2010 vol:1313 pg:259 -69

33. H. Boutin. Role of IL-1 α and IL-1 β in Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience*, August 1, 2001, 21(15):5528–5534

34. Qi-Hui Zhai. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF- α , IL-1 β and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neurological Sciences* 152 (1997) 119–124.

35. Elsmén E, Ley D, Cilio CM, Hansen-Pupp I, Hellstrom-Westas L. Umbilical cord levels of interleukin-1 receptor antagonist and neonatal outcome. *Biol Neonate*. 2006; 89(4):220-6. Epub 2005 Nov 21.

36. Bao XJ. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and anti-inflammatory and angiogenesis effects in an intracerebral hemorrhage rat model. *Int J Mol Med*. 2013 31(5):1087-96.

37. Soon-Tae Lee. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain*, 2008; 131, 616629

38. Silveira RC, Procianoy RS. Ischemic brain damage in very low birth weight preterm newborn infants. *J Pediatr (Rio J)* 2005 Mar; 81(one Suppl):S23-32.

39. Baud O. Antenatal corticosteroid therapy: benefits and risks. *Acta Paediatr Suppl* 2004 Feb; 93(444):6-10.

40. Carteaux P, Cohen H, Check J, George J, McKinley P, Lewis W, et al. Evaluation and development of potentially better practices for the prevention of brain hemorrhage and ischemic brain injury in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003 Apr; 111(4 Pt 2):e489-96

41. Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Animal models of germinal matrix hemorrhage. *J Child Neurol* 2006 May; 21(5):365-71

42.Xue M, Balasubramaniam J, Buist RJ, Peeling J, Del Bigio MR. Periventricular/intraventricular hemorrhage in neonatal mouse cerebrum. *J Neuropathol Exp Neurol*2003 Nov; 62(11):1154-65.

43.Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*1990 May; 21(5):801.

44.Xue M, Del Bigio MR. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*2003 May-Jun; 12(3):152-9.

45.Belayev L, Saul I, Curbelo K, Busto R, Belayev A, Zhang Y, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model. *Stroke*2003 Sep;34(9):2221-7.

6. ANEXO: NORMAS DE AVALIAÇÃO DO PERIÓDICO BRAIN RESEARCH

29/07/13

Guide for authors | Brain Research | 0006-8993 | Elsevier

ELSEVIER

Type here to search on Elsevier.com

Advanced search

Follow us

Help & Contact

Journals & books

Online tools

Authors, editors & reviewers

About Elsevier

Store

Browse journals > Brain Research > Guide for authors

Guide for Authors



Author information pack

BEFORE YOU BEGIN

- Ethics in publishing
- Conflict of interest
- Submission declaration
- Changes to authorship
- Copyright
- Role of the funding source
- Funding body agreements and policies
- Open access
- Language (usage and editing services)
- Submission
- Referees

PREPARATION

- Use of wordprocessing software
- Article structure
- Essential title page information
- Graphical abstract
- Highlights
- Abbreviations
- Acknowledgements
- Units
- Database linking
- Artwork
- Tables

• References

• Video data

• AudioSlides

• Supplementary data

• 3D neuroimaging

• Submission checklist

AFTER ACCEPTANCE

• Use of the Digital Object Identifier

• Proofs

• Offprints

AUTHOR INQUIRIES

Guide for authors

Submit your paper

Track your paper

Order journal

View articles

Abstracting and indexing

Editorial board

INTRODUCTION

Brain Research publishes papers reporting interdisciplinary investigations of nervous system structure and function that are of general interest to the international community of neuroscientists. As is evident from the journal's name, its scope is broad, ranging from cellular and molecular studies through systems neuroscience, cognition and disease. Invited reviews are also published; suggestions for and inquiries about potential reviews are welcomed.

Note: With the appearance of the final issue of the 2011 subscription, Vol. 67/1-2 (24 June 2011), *Brain Research Reviews* has ceased publication as a distinct journal separate from *Brain Research*. Review articles accepted for *Brain Research* are now published in that journal.

In the journal's Table of Contents, published papers will be shown under one of the Section titles listed (in bold type) below. Authors will be given the opportunity to choose the most appropriate section upon manuscript submission.

SECTIONS

Cell Biology, Signaling and Synaptic Transmission

Senior Editors: Leonard K. Kaczmarek (New Haven, CT, USA), Diane Lipscombe (Providence, RI, USA)

Studies investigating the cellular, molecular and genetic bases of structure, function and signaling (both intracellular and intercellular) in nervous systems.

Cognition and Computation

Senior Editors: Francesco P. Battaglia (Amsterdam, Netherlands), Erich Schröger (Leipzig, Germany), Christina L. Williams (Durham, NC, USA)

Studies of the neural mechanisms of cognition and behavior in humans and animal models including basic behaviors and higher mental functions; as well as studies dealing with realistic simulation, analysis and prediction of the structure and functions of nervous systems and individual neuronal and glial elements within nervous systems.

Development, Degeneration and Regeneration, and Aging

Senior Editors: Fen-Biao Gao (Worcester, MA, USA), Michael E. Selzer (Philadelphia, PA, USA), Flora M. Vaccarino (New Haven, CT, USA)

Studies concerning neuronal and glial development and the formation of the nervous system, molecular and cellular aspects of degeneration and regeneration, and changes associated with the aging brain.

Neurobiology of Disease

Senior Editors: Lorraine Iacovitti (Philadelphia, PA, USA), Jae-Young Koh (Seoul, Korea), Brian A. MacVicar (Vancouver, Canada), Peter H. Reinhart (Boston, MA, USA), J. Paul Taylor (Memphis, TN, USA)

Studies whose primary focus is on clinically diseased nervous systems or disease models, including molecular, cellular, systems and behavioral approaches and analysis of therapeutic interventions.

Reviews

Senior Editor: Irwin B. Levitan (Philadelphia, PA, USA)

Invited reviews on all aspects of nervous system structure and function. The editors welcome suggestions for specific review topics.

Systems Neuroscience and Behavior

Senior Editors: Gary Aston-Jones (Charleston, SC, USA), Leslie C. Griffith (Waltham, MA, USA), David J. Perkel (Seattle, WA, USA)

Studies concerning structure and organization of neural circuits, sensory and motor systems, internal regulatory systems and the control of behaviors.

TYPES OF PAPERS

1. Research Reports reporting results of original fundamental research in any branch of the brain sciences. Papers describing new methods or significant developments of recognised methods which provide significant insight into the structure or function of the nervous system, the pathophysiology of a disease, or its treatment may also be submitted. Articles should be written in sufficient detail to allow others to verify/replicate the described methods.

2. Reviews: Reviews are by invitation only. Inquiries and suggestions for reviews should be directed to the *Brain Research* Editorial Office (bres@elsevier.com).

Brain Research will also regularly publish **thematic special issues** highlighting important new developments in neuroscience research.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Brain Research 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 *Brain Research* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of *Brain Research*. (N.B. Only manuscripts which were first submitted to another journal after 1st January 2008 are eligible for the NPRC scheme.)

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 *Brain Research*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Brain Research* 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 *Brain Research* specification and submit the paper to *Brain Research* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that they are happy for referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. Authors will be asked upon submission to *Brain Research* the title of the first journal submitted to and the manuscript ID that was given by that journal. The editorial office of *Brain Research* will request the referees' reports from the first journal.

The Editors of *Brain Research* 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.

Contact Details for submission

Submission of manuscripts to *Brain Research* is entirely online at <http://ees.elsevier.com/bres>. Queries about the submission or editorial processes may be directed to the Brain Research Editorial Office, Elsevier, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA; Fax: (1)-619-699.6850, Email: bres@elsevier.com



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

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

Conflict 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. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration

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 <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), 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 including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts

Before the accepted manuscript is published in an online issue Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include:

- The reason the name should be added or removed or the author names rearranged.
- Written confirmation (email, fax, 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.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that:

- Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests.
- Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue

Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, 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. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). 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 (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). 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: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

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. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

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 their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our

access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

• No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to 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-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

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.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access in this journal is **\$1,800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

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 <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

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 source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bres>

Section, Senior Editor and Reviewers

Authors will be asked during manuscript submission to select a section of the journal, and a senior editor from that section whom they consider most appropriate to edit their manuscript. While every effort will be made to honor authors' selections, the assignment to a handling editor will be made by the Editor-in-Chief. Please submit, with the manuscript, the names, addresses and email addresses of 3 potential reviewers. Note that the handling editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

Cover illustrations: Authors are encouraged to submit visually and scientifically interesting figure(s) representative of their data, though not necessarily as they appear in the manuscript, for potential cover illustrations (see specific instructions for submission of cover art under *PREPARATION / Color Artwork below*). The use of illustrations for journal covers is at the discretion of the Editors; only those related to articles accepted for publication will be considered. At the end of each year, all published covers will automatically be considered in a competition for the year's best cover illustration, and will be judged on their aesthetic value and scientific interest. The author(s) of the winning image will receive US\$ 500 from Elsevier.



Preparation

Use of wordprocessing software

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

Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

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

Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined and numbered sections (e.g. Abstract, 1. Introduction, 2. Results, 3. Discussion, 4. Experimental Procedure, Acknowledgements, References). Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for

internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide relevant background information. Published studies should be described concisely, and be cited appropriately.

Results

The results should be described clearly and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

Discussion

The results of the research should be discussed in the context of other relevant published work; Extensive citations and discussion of published literature should be avoided. 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 section.

Experimental Procedure

This section should contain all the details necessary to reproduce the experiments. Avoid re-describing methods already published; only relevant modifications should be included in the text.

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.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case 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 phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be 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

The abstract should state briefly (in no more than 250 words) 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

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also 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 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). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

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.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click 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: xxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported

databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

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

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

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

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

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Cover art: Illustrations to be considered for the cover should be related to the authors' submitted article and be representative of their data, but need not necessarily be as they appear in the manuscript. Cover art should be formatted to occupy an area of 18X21 cm and should be submitted in digital format (TIFF, Photoshop, JPEG or Powerpoint) with a resolution of at least 300 dpi. Please also include a descriptive text with your cover art submission. The files should be uploaded to a specified FTP site - please contact the Editorial Office at bres@elsevier.com for instructions. For authors who wish to postal mail a CD with the cover art, please send it to: Brain Research Editorial Office, Elsevier, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA. Please ensure that the manuscript reference number is included on all materials.

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 on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

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

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

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.

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 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 and issue/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.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog (Journals referenced in the NCBI Databases): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>;

CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

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 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. 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 at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. 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.

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 at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to 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. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

3D neuroimaging

You can enrich your online articles by providing 3D neuroimaging data in NIFTI format. This will be visualized for readers using the interactive viewer embedded within your article, and will enable them to: browse through available neuroimaging datasets; zoom, rotate and pan the 3D brain reconstruction; cut through the volume; change opacity and color mapping; switch between 3D and 2D projected views; and download the data. The viewer supports both single (.nii) and dual (.hdr and .img) NIFTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is 100 MB or less. Multiple datasets can be submitted. Each dataset will have to be zipped and uploaded to the online submission system via the '3D neuroimaging data' submission category. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. Note: all datasets will be available for downloading from the online article on ScienceDirect. If you have concerns about your data being downloadable, please provide a video instead. For more information see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>.

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
- Phone numbers

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'
 - References are in the correct format for this journal
 - 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 Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

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 Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

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 return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. 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 – please let us have all your corrections within 48 hours. 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). 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 (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticleservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Readers	Authors	Librarians	Editors	Reviewers	Advertisers/ Sponsors	Societies
View Articles	Guide for Authors	Ordering Information	Article Tracking for Editors	Reviewer Guidelines	Advertisers Media Information	
Volume / Issue alert	Submit your paper	Abstracting/ Indexing		Log in as Reviewer		
	Track Your Paper					
	Webshop					
	Author information pack					

