



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EFEITOS DO DIMORFISMO SEXUAL EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EM  
RATOS WISTAR**

**Dirceu Cardoso Aristimunha**

**Porto Alegre, dezembro de 2019.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EFEITOS DO DIMORFISMO SEXUAL EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EM  
RATOS WISTAR**

**Dirceu Cardoso Aristimunha**

**Orientador: Profº Dr. Carlos Alexandre Netto**

**Coorientadora: Dra. Luz Elena Duran-Carabali (PNPD)**

**Porto Alegre, dezembro de 2019.**

Este manuscrito foi elaborado segundo as normas da revista *Brain Research* na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca avaliadora.

Effects of sexual dimorphism in an experimental model of intracerebral hemorrhage in

*Wistar rats*

Aristimunha D<sup>1,2</sup>, Durán-Carabali LE<sup>1</sup>, Cordeiro JL<sup>1</sup>, Neves JD<sup>1</sup>, Odorcyk F<sup>1</sup>, Sanches EF<sup>1</sup>, Schlemmer L<sup>1</sup>, Carvalho AS<sup>1</sup>, Mattos M<sup>1</sup>, Netto CA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>2</sup>*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Autor correspondente:

Prof<sup>a</sup> Dr. Carlos Alexandre Netto

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Ramiro Barcelos, Nº 2500, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90035-003

E-mail: netto@gabinete.ufrgs.br

## RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma síndrome neurológica com altas taxas de morbidade e mortalidade. Apresenta grande prevalência em adultos e idosos, sendo uma das principais causas de internação hospitalar. A Hemorragia Intracerebral (HIC) tem uma incidência anual de 10 a 30 casos por 100.000 habitantes, representando 10-15% dos cerca de 15 milhões de AVE em todo o mundo. Esta condição de saúde tem um alto impacto na qualidade de vida da população acometida, bem como uma alta demanda de suporte social e familiar. O modelo experimental em roedores com a injeção intracerebral de colagenase, tem sido amplamente usado no estudo da HIC, ao mimetizar algumas das características neuropatológicas observadas na clínica. A presença ou ausência dos hormônios gonadais é talvez a maior diferença biológica entre machos e fêmeas, os quais apresentam diferentes respostas comportamentais, morfológicas e neuroquímicas, tanto em condições fisiológicas como em diversas patologias. Desse modo, este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo avaliar os efeitos do dimorfismo sexual em modelo murino de hemorragia intracerebral, sobre os prejuízos comportamentais, celulares e morfológicos na fase subaguda da lesão. Para isso, foram utilizados 132 ratos Wistar (48 machos e 84 fêmeas), com idade de 90 dias. Após anestesia, os animais foram injetados no estriado esquerdo com 0,2U de colagenase bacteriana para indução da HIC ou 0,5 $\mu$ L de salina estéril no grupo sham. Setenta e duas horas após a lesão, os animais foram avaliados no teste do cilindro, teste da escada horizontal e escore neurológico para avaliar os prejuízos motores decorrentes da HIC. Em seguida, um grupo de animais foram submetidos a eutanásia para à análise por citometria de neurônios (NeuN), astrócitos (GFAP), microglia (CD11b) e apoptose (caspase 3 clivada). Outros animais foram perfundidos com salina e paraformaldeído (PFA) 4% para análises morfológicas do cérebro. Os ratos HIC machos tiveram um maior déficit motor quando comparados ao grupo HIC fêmeas. Também foi observado aumento no número de astrócitos nos machos quando comparados a todos os demais grupos. Houve diferenças entre os sexos na quantificação de microglia/macrófagos, onde os machos tiveram uma maior proporção desse tipo celular independentemente da lesão, e em consequência disso, a morte desse tipo celular por apoptose também é maior. Nosso estudo foi um dos primeiros a comparar as respostas dos sexos após HIC em modelo experimental sob as mesmas condições e parâmetros. Embora mais estudos são necessários para elucidar as diferentes respostas que o sexo produz sobre a HIC, nossos achados apontam para alvos terapêuticos já conhecidos, como astrócitos e microglia, de maneira que futuros tratamentos para a HIC possam ser realizados de forma distinta entre homens e mulheres para atingir melhor os desfechos.

## ABSTRACT

Stroke is a neurological syndrome with high morbidity and mortality rates. It has a high prevalence in adults and the aging population, being one of the main causes of hospitalization. Intracerebral Hemorrhage (ICH) has an annual incidence of 10 to 30 cases per 100,000 inhabitants, representing 10-15% of the approximately 15 million strokes worldwide. This health condition has a high impact on the quality of life of the affected population, as well as a high demand for social and family support. The rodent experimental model with an intracerebral injection of collagenase has been widely used to study ICH, by mimicking some neuropathological characteristics observed in clinical settings. Presence or absence of gonadal hormones is perhaps the biggest biological difference between males and females, which display different behavioral, morphological and neurochemical responses, both under physiological conditions and several neuropathologies. The aim of the present study was to evaluate the effects of sexual dimorphism in a murine model of intracerebral hemorrhage, on behavioral, cellular and morphological changes at subacute stage of the lesion. A total of 132 Wistar rats (48 males and 84 females) at 90 days of age was used. After anesthesia, animals were injected with 0.2 U of bacterial collagenase into the left striatum to induce ICH or 0.5  $\mu$ L sterile saline in the sham group. Seventy-two hours post-injury, animals were evaluated in the cylinder test, ladder walking test and neurological score, in order to determine sensorimotor impairment induced by ICH. A group of animals were euthanized for cellular analyses of neuron (NeuN), astrocytes (GFAP), microglia (CD11b) and cell death by apoptosis (cleaved caspase 3) through technique. Another group was perfused with saline and 4% PFA for morphological analysis. Male ICH rats had higher motor deficits when compared to the female ICH group. Moreover, an increase astrocytes number was also observed in male rats when compared to other groups. There were a gender differences in microglia/macrophage quantification, in which males had a higher proportion regardless of injury, in consequence the death of this cell type by apoptosis is also higher. Our study was one of the first to compare sex responses after experimental model of ICH, under the same conditions and parameters. Although more studies are needed to elucidate the different responses cause by sex, our findings pointing out known therapeutic targets such as astrocytes and microglia, so, future treatments for ICH can be performed differently between men and women, achieving better outcomes.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. HEMORRAGIA INTRACEREBRAL**

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma síndrome neurológica com altas taxas de morbidade e mortalidade. Apresenta grande prevalência em adultos e idosos e uma das principais causas de internação hospitalar (Botelho et al., 2016). Ele é subdividido em isquêmico, onde há uma interrupção do aporte sanguíneo causado por uma obstrução de vasos ou hemorrágico, dado pela ruptura de um vaso, que com leva a um extravazamento de sangue dentro do parênquima cerebral. A hemorragia intracerebral (HIC) apresenta uma incidência anual de 10 a 30 casos por 100.000 habitantes, representando 10 a 15% dos cerca de 15 milhões de Acidentes Vasculares Encefálicos (AVE) em todo o mundo (Qureshi et al., 2009). Estudos também demonstram que cerca de 30 a 40% de todos os eventos isquêmicos encefálicos evoluem para quadros hemorrágicos (Castillo et al., 2002).

No Brasil, o AVC é a principal causa de incapacidade, com uma incidência anual de 108 para cada 100 mil habitantes, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa síndrome apresenta um alto custo para o governo. (BRASIL, 2013). O Ministério da Saúde (Brasil) reportou que entre 2010 e 2016, a taxa de mortalidade por Acidente Vascular Cerebral (AVC) reduziu em 11% tanto para homens como para mulheres, no entanto, a população do sexo masculino continua sendo a mais afetada, como mostrado na Tabela 1. Para o cálculo destes dados, o estudo Saúde Brasil utilizou as populações publicadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); e para a taxa padronizada, o Censo Brasileiro de 2010.

A hemorragia intracerebral não traumática resulta da ruptura espontânea dos vasos sanguíneos no cérebro. Os sinais e sintomas dependem do local da lesão, podendo ser encontrados vários tipos de acometimentos (Valente et al., 2010). Grande parte das HIC's estão relacionados à hipertensão sistêmica que geram uma ruptura espontânea de pequenas artérias ou arteríolas penetrantes a partir de micro aneurismas (Fisher, 1971;1972). Atualmente, a literatura mostra que os principais fatores de risco do AVC podem ser divididos em três grupos, podendo ser modificáveis [hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, diabetes mellitus] ou não modificáveis (idade, gênero,

raça) e grupo de risco potencial tais como sedentarismo, obesidade e alcoolismo (Brasil, 2013).

**Tabela 1.** Taxas padronizadas (x 100 mil habitantes) por sexo da incidência de acidente vascular cerebral nos períodos de 2010 e 2016 por faixa etária – Brasil. (Adaptado de SAÚDE BRASIL 2018 Uma análise da situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas).

FAIXA ETÁRIA	30 A 69 anos		70 anos ou mais		Todas as idades	
	2010	2016	2010	2016	2010	2016
SEXO FEMININO	39,5	35,2	572,4	517,9	49,3	43,4
SEXO MASCULINO	55,8	50,9	784,8	722,2	70,1	62,5

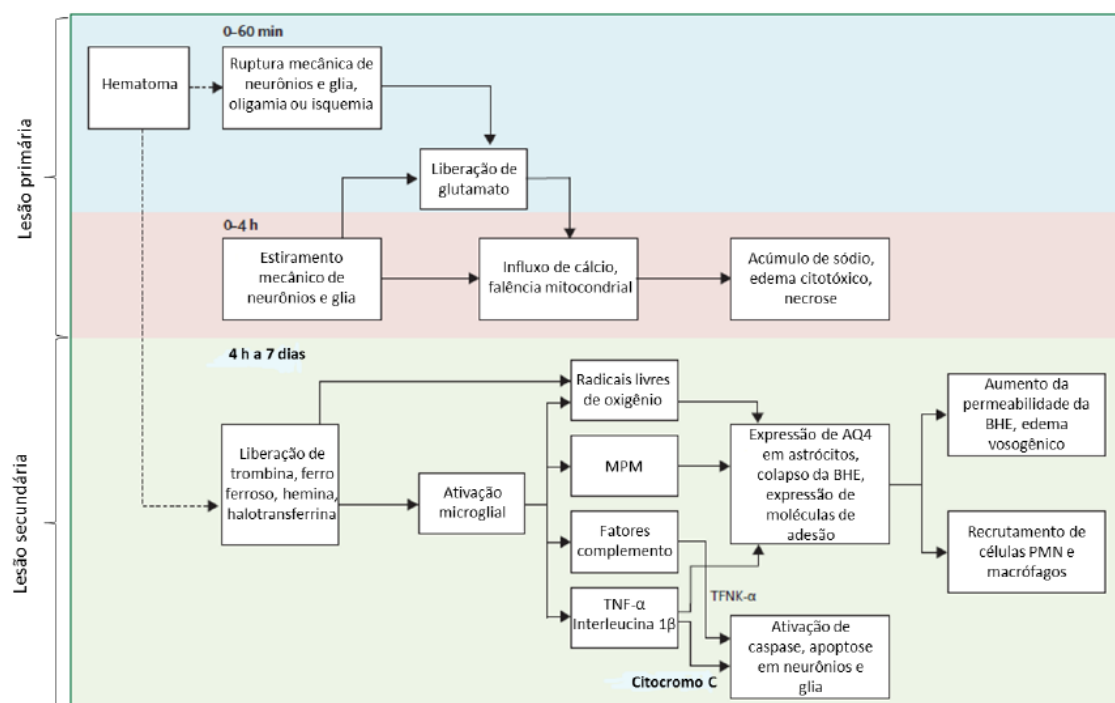
A HIC é a forma mais devastadora de AVE. Apresenta taxas de mortalidade de 30 a 50% e pobre recuperação funcional (Mayer; Rincón, 2005; Thirift; Donnan; McNeil, 1995). Tanto estudos experimentais quanto clínicos demonstram uma deterioração neurológica aguda nas primeiras horas a dias após à HIC (Rosemberg, 2002; Sukumari-Ramesh; Alleyne; Dhandapani, 2012; Young et al., 2001). A literatura traz também que grande parte das mortes decorrentes da HIC ocorrem nas primeiras 48 horas após o evento (Fewel; Thompson; Hoff, 2003; Hemphill et al., 2001), reforçando a necessidade de terapias rápidas e efetivas em reduzir o dano que continua a ocorrer após a entrada do paciente ao hospital (Neves, 2015).

Embora não exista um tratamento comprovadamente eficaz e capaz de reduzir a mortalidade e melhorar os desfechos da HIC (Fiorella et al., 2015), aqueles que sobrevivem costumam apresentar prejuízos sensório-motores como hemiparesia, incoordenação e espasticidade, os quais podem variar de acordo com o local e extensão da lesão, podendo ser severamente incapacitantes (Cheon, 2015).

Diversos autores trazem que o mecanismo de lesão da HIC envolve duas fases (conforme ilustrado na Figura 1); inicialmente há o chamado efeito de massa que decorre da formação do hematoma, provocando uma compressão mecânica, seguida de isquemia e edema tecidual. Em seguida, ela se agrava a partir de produtos da degradação sanguínea decorrente da hemólise, gerando uma cascata de ativação pró-inflamatória e respostas oxidativas (Wagner et al., 2003; Aronowski e Hall, 2005; Xi et al., 2006; Hanley, 2009). As regiões adjacentes ao hematoma são caracterizadas por edema, apoptose, necrose e pela presença de células inflamatórias (Qureshi et al., 2003a). Já a compressão mecânica induzida pelo hematoma causará um dano neuronal e glial, com a liberação de

neurotransmissores, disfunção mitocondrial e despolarização da membrana (Qureshi et al., 2003b; Lusardi et al., 2004; Graham et al., 2000). Após a formação dessa lesão inicial, o dano pode variar de uma supressão metabólica temporária a um edema celular e necrose. A cascata de lesão que se sucede após o hematoma é iniciada pelos produtos da coagulação e ruptura da hemoglobina, em particular, a trombina, que ativa a microglia quatro horas após o dano (Xi et al., 2006). A microglia ativada libera produtos que induzem o colapso da barreira hematoencefálica (BHE), edema vasogênico e apoptose em neurônios e células gliais (Qureshi et al., 2009; Kirkman et al., 2011; Brunswick et al., 2012).

Uma vez que o ferro também é um dos produtos de degradação da hemoglobina, a sobrecarga de ferro pode reagir com o oxigênio e produzir radicais hidroxilas no encéfalo, causando dano oxidativo, como a peroxidação lipídica após a HIC (Koeppen et al., 2004; Wagner et al., 2003; Wu et al., 2003). O estresse oxidativo gerado a partir do dano hemorrágico pode interferir na atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, com consequente despolarização das membranas e aumento dos níveis de cálcio intracelular, levando a mecanismos que causam necrose celular e agravam a lesão (Hagber et al., 2009).



**Figura 1.** Sequência da lesão neural iniciada pela hemorragia intracerebral. BHE= Barreira hematoencefálica; MPM= Metalopeptidases de matriz; TNF= Fator de necrose tumoral; PMN= Células polimorfonucleares (Qureshi; Mendelow; Hanley, 2009).



## **1.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO**

No encéfalo, muitos tipos celulares como neurônios, microglia e células endoteliais podem ser fonte ou alvo de mediadores inflamatórios. Na HIC, sugere-se que a sinalização dependente do receptor Toll-like 4, tanto na microglia residente quanto nos monócitos e leucócitos infiltrantes periféricos, estão envolvidos na inflamação induzida pela HIC. A inflamação age com um regulador da resposta de defesa contra a lesão, iniciando imediatamente após a liberação dos componentes sanguíneos no parênquima. (Neves, 2015).

Acredita-se que a microglia residente e os astrócitos sejam os primeiros tipos celulares a responderem a esse insulto (Rolland et al., 2013; Wang, Doré, 2007<sup>a</sup>; Wang, 2010), envolvendo a infiltração de células inflamatórias como os leucócitos, macrófagos e células T (Aronowski; Hall, 2005; Gao et al., 2008; Wagner, 2007), seguido da liberação de várias citocinas, quimiocinas, radicais livres e outros químicos tóxicos como as metaloproteinases (MMP's) (Aronowski; Hall, 2005; Gao et al., 2008; Wang, Doré, 2007<sup>a</sup>; Wang; Tsirka, 2005<sup>a</sup>). Logo, se faz necessário o estudo das células participantes na resposta inflamatória à HIC, de maneira a buscar elucidar melhor suas respostas contra à lesão e proporcionar melhores alvos terapêuticos para estudos posteriores.

## **1.3. MODELO ANIMAL DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL**

Atualmente, existem diversos modelos animais de AVC em uma variedade de espécies que incluem primatas, porcos, coelhos, ratos, camundongos dentre outros, que têm como objetivo avaliar a fisiopatologia, consequências clínicas, testar estratégias terapêuticas e avaliar fatores de risco para AVC, bem como para investigar os efeitos de comorbidades resultantes do AVC (Yan et al., 2015).

Dentre os modelos utilizados em murínos para mimetizar a lesão de HIC pode-se citar a injeção intracerebral de collagenase. As collagenases são enzimas proteolíticas que estão presentes nas células de uma forma inativa e são secretadas nos locais de inflamação por células mononucleares ou metastáticas. Uma vez que o tecido cerebral

contém colágeno na região da lâmina basal dos vasos sanguíneos, essas enzimas irão degradá-las de formas a provocar o extravazamento sanguíneo (Rosemberg et al., 1990).

Esse modelo talvez seja o mais realístico, já que a partir da ruptura dos vasos, o hematoma produzido irá aumentar a pressão intracraniana, embora ele não seja capaz de mimetizar a ruptura de um único vaso, o que ocorre geralmente em humanos. Apesar das limitações deste modelo, ele ainda é o que apresenta um maior colapso da BHE, bem como do estriado, substância nigra, substância branca e córtex (MacLellan et al., 2008). Com base nos resultados obtidos deste experimento, foi constatado que este modelo é o melhor para avaliar a progressão da lesão encefálica, como a morte celular ou dano à BHE.

Com base nessas evidências, o modelo de HIC utilizando colagenase foi o escolhido visto que os parâmetros a serem estudados neste trabalho seriam contemplados de uma melhor forma, mimetizando o que se encontra na clínica.

#### **1.4. DIMORFISMO SEXUAL**

Sabe-se que há diferenças fisiológicas entre homens e mulheres. A presença ou ausência dos hormônios gonadais é talvez a maior diferença biológica entre os sexos, sendo conhecida por afetar o cérebro nas respostas às mais diversas lesões (Liu et al., 2010). As alterações hormonais durante a menopausa também foram associadas à incidência e resultado de acidente vascular hemorrágico. Além disso, a administração exógena de estrogênio e progesterona melhorou os resultados nos modelos de HIC (Feldmann; Auriat; Nakamura, 2005).

Atualmente, o dimorfismo sexual tem sido objeto de diversas pesquisas devido a sua relevância para o estudo do SNC, onde machos e fêmeas têm mostrado diferentes respostas comportamentais, morfológicas e neuroquímicas, tanto em condições fisiológicas como em diversas patologias (Cahill, et al., 2015). Embora as evidências clínicas e pré-clínicas sobre as respostas distintas entre sexos a fatores extrínsecos como estímulos ambientais, administração de fármacos, nutrição, entre outros, com frequência os estudos são apresentados sem estratificação sexual durante as análises e as fêmeas eram em grande parte excluídas, com exceção das pesquisas acerca de comportamentos reprodutivos (Flórez-Vargas et al., 2016).

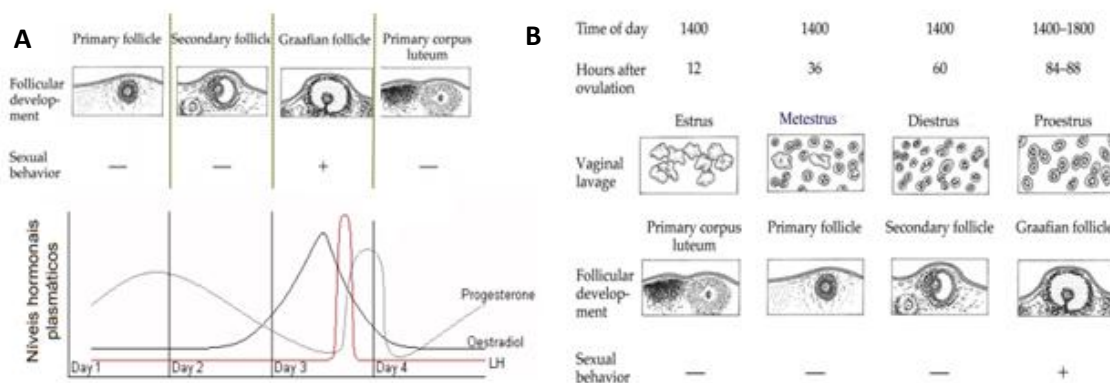
Em um estudo de revisão sobre o dimorfismo sexual em parâmetros comportamentais e neuroquímicos de ratas, os autores relatam que dentre 443 artigos publicados entre outubro de 2010 e 2011, apenas 17% empregaram ratas fêmeas, 11% usaram ambos os sexos, e a maioria (72%) utilizou apenas ratos machos (Simpson et al., 2011).

Uma vez que já há relatos literatura mostrando que homens e mulheres respondem de formas diferentes às mais diversas patologias existentes, a necessidade de se investigar ainda mais sobre essas diferenças sobre a HIC, se faz necessária, já que os tratamentos diferenciados na clínica para homens e mulheres podem se fazer necessários para um melhor prognóstico destes pacientes.

## 1.5. CICLO ESTRAL

O ciclo estral das ratas tem uma duração aproximada de quatro a cinco dias e é caracterizado por quatro fases: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro, as quais geralmente são determinadas pela observação em microscopia dos tipos celulares encontrados no esfregaço vaginal (Marcondes et al., 2002).

Durante o ciclo estral, a prolactina, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) permanecem baixos e só aumentam na tarde da fase proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, atingindo seu pico durante o proestro e retornando à linha de base no estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro com uma posterior diminuição. Em seguida, o valor da progesterona aumenta para atingir seu segundo pico no final do proestro (Spornitz et al., 1999; Smith et al., 1975) como mostra a Figura 2.



**Figura 2.** (A) Níveis hormonais plasmáticos e desenvolvimento folicular. (B) Fases do ciclo estral acompanhado de sua duração. (Adaptado de “*An introduction to Behavioural Endocrinology*” Randy J. Nelson, 2005).

O estro é a fase na qual a fêmea se encontra mais receptiva ao macho. A fase do proestro dura de 12 a 14 horas, quando ocorre a maturação de um ou mais folículos, com a presença de células epiteliais no esfregaço; e precede a fase de estro (25 a 27 horas) quando ocorre o coito; (este é identificado pela presença de células cornificadas no esfregaço). Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro, cuja duração é de 24 a 48 horas, seguido pelo diestro, que dura aproximadamente 24 horas, quando reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo; segue-se a esta fase um novo proestro (Aires, 1999).

Considerando as diferenças sexo-específicas em respostas fisiopatológicas e comportamentais entre machos e fêmeas, o objetivo do presente trabalho, de conclusão de curso foi avaliar os efeitos do dimorfismo sexual em modelo murino de hemorragia intracerebral por injeção de collagenase, sobre os prejuízos comportamentais, celulares e morfológicos na fase subaguda da lesão. Além disso, foi testada a hipótese de que a severidade da lesão nas fêmeas poderia estar sendo influenciada pelo ciclo estral nos quais elas se encontram no momento da lesão.

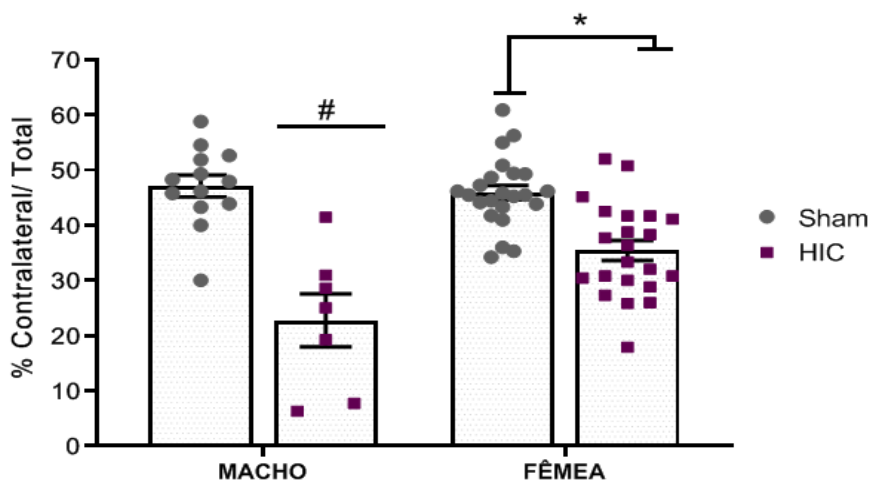
## **2. RESULTADOS**

A fim de elucidar possíveis respostas sexo-específicas no modelo experimental de hemorragia intracerebral, foram feitas análises comportamentais e bioquímicas (citometria) 72 horas após a lesão.

### **2.1. Os machos submetidos a HIC apresentaram maior assimetria no uso das patas anteriores**

A análise dos dados do teste do cilindro mostrou uma interação entre a lesão e sexo ( $F_{(1,64)} = 9,583$ ;  $p = 0,003$ ) indicando que tanto o grupo HIC macho quanto o grupo HIC fêmea tiveram uma redução significativa no uso do membro anterior contralateral à lesão, quando comparados aos seus respectivos grupos sham. Entretanto, foi observado

que o grupo HIC macho mostrou uma redução muito maior, sendo estatisticamente diferente de todos os demais grupos (Figura 3).

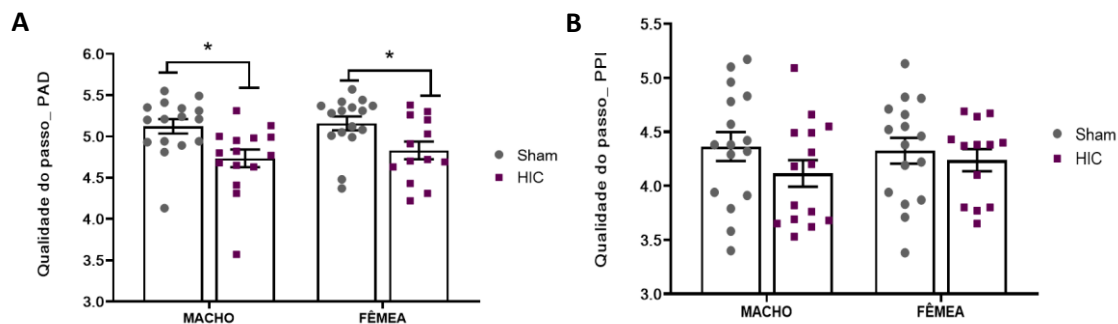


**Figura 3.** Efeito da HIC sobre a assimetria no uso das patas anteriores quando avaliado no teste do cilindro em machos (n=12-15) e fêmeas (n=12-15). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença entre o grupo sham e HIC, e # diferença entre todos os grupos. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan, ( $p < 0.05$ ).

## 2.2. A HIC reduziu a qualidade do passo durante a marcha e afetou a coordenação motora, tanto em machos como em fêmeas

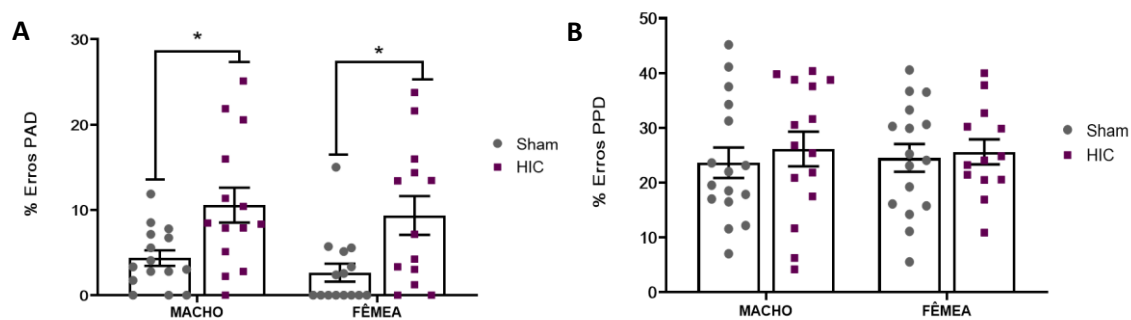
Na avaliação do teste de escada horizontal sobre a qualidade do passo com a pata anterior direita (lado contralateral à lesão), foi observado apenas o efeito da lesão ( $F_{(1,59)} = 14,018$ ,  $p = 0,0001$ ) onde, machos e fêmeas HIC apresentaram um prejuízo na qualidade no passo quando comparados aos seus respectivos grupos sham. Não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os sexos (Figura 4A).

Com relação à avaliação da pata posterior direita não foram observados o efeito da lesão entre machos e fêmeas quando comparados aos seus respectivos grupos shams, assim como não foi observado diferenças significativas na comparação entre os sexos ( $p > 0,05$ ), (Figura 4B).



**Figura 4.** Avaliação da qualidade do passo no teste da escada horizontal em machos (n=12-15) e fêmeas (n=12-15). A) Pata anterior direita (PAD) e B) pata posterior direita (PPD). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença entre o grupo sham e HIC. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan, ( $p < 0,05$ ).

Como apresentado na Figura 5A, a análise do percentual de erros cometidos com a pata anterior direita, evidenciou o efeito da lesão onde, machos e fêmeas HIC tiveram um maior número de erros proporcionais ao número de passos, quando comparados aos seus respectivos grupos sham ( $F_{(1,57)} = 13,962$ ,  $p = 0,0001$ ). Novamente, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os sexos, nem na avaliação do percentual de erros com a pata posterior direita ( $p > 0,05$ ); (Figura 5B).

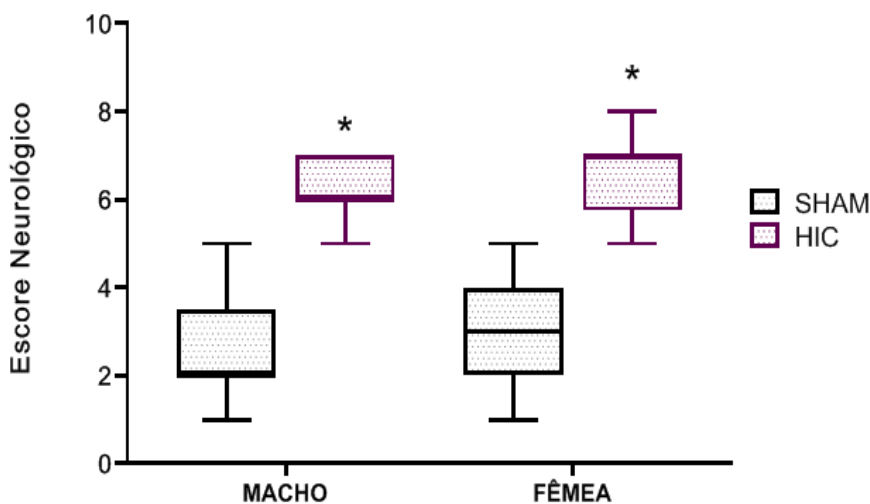


**Figura 5.** Avaliação do percentual de erros dados no teste da escada horizontal em machos (n=12-15) e fêmeas (n=12-15). A) Pata anterior direita (PAD) e B) pata posterior direita (PPD). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença entre o grupo sham e HIC. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan, ( $p < 0,05$ ).

### 2.3. A HIC causa comprometimento neurológico em animais de ambos os sexos

A análise do escore neurológico mostrou apenas efeito da lesão onde, os machos e fêmeas HIC obtiveram uma menor pontuação quando comparados aos seus respectivos

grupos sham, conforme indicado na Figura 6 ( $X^2_{(3)} = 53,492$ ,  $P = 0,0001$ ). Não foram observadas diferenças sexo-específicas para este teste ( $p > 0,05$ ).

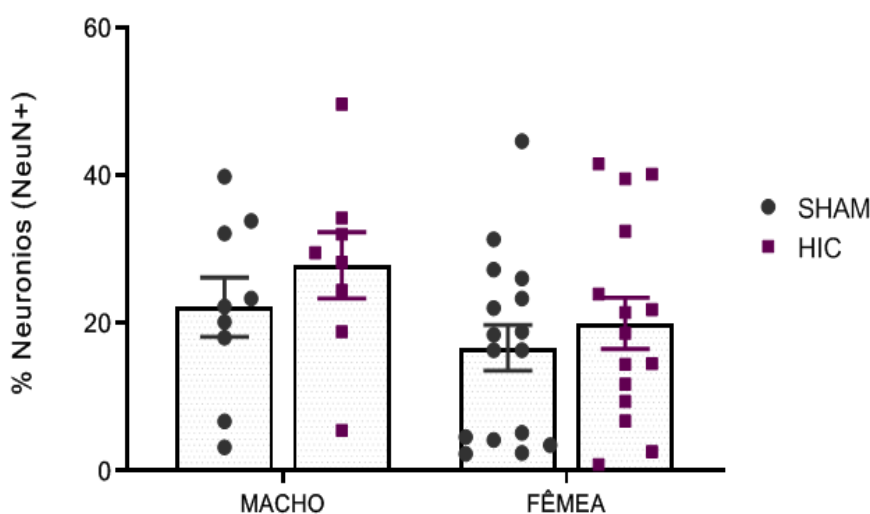


**Figura 6.** Pontuação do escore neurológico entre machos ( $n = 12-15$ ) e fêmeas ( $n = 12-15$ ). Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (p25 e p75) \*Diferença entre o grupo sham e HIC. Teste de Kruskal Wallis, segundo do teste de comparações múltiplas de Dunn, ( $p < 0,05$ ).

## 2.4. CITOMETRIA

### 2.4.1. HIC não alterou a proporção de neurônios em até 72 horas

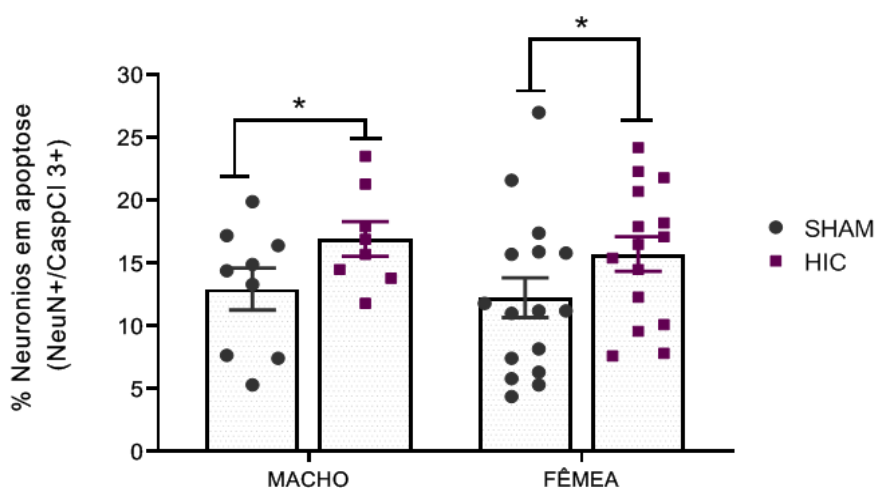
A citometria realizada 72 horas após a HIC no estriado ipsilateral não demonstrou diferenças significativas entre os grupos sham e lesão, assim como, não foi observado efeito do sexo, Figura 7 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7.** Proporção do número de neurônios no estriado ipsilateral, 72h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células NeuN(+)  $\pm$  EPM. n=7-8 por grupo. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas), ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.2. A HIC causou um aumento na morte neuronal por apoptose, independente do sexo.

Na quantificação de neurônios em apoptose no estriado ipsilateral, foi observado um aumento de neurônios em apoptose nos grupos macho e fêmea HIC quando comparados a seus respectivos controles ( $F_{(1,47)} = 5,125$ ,  $p = 0,029$ ), como mostrado na Figura 8.

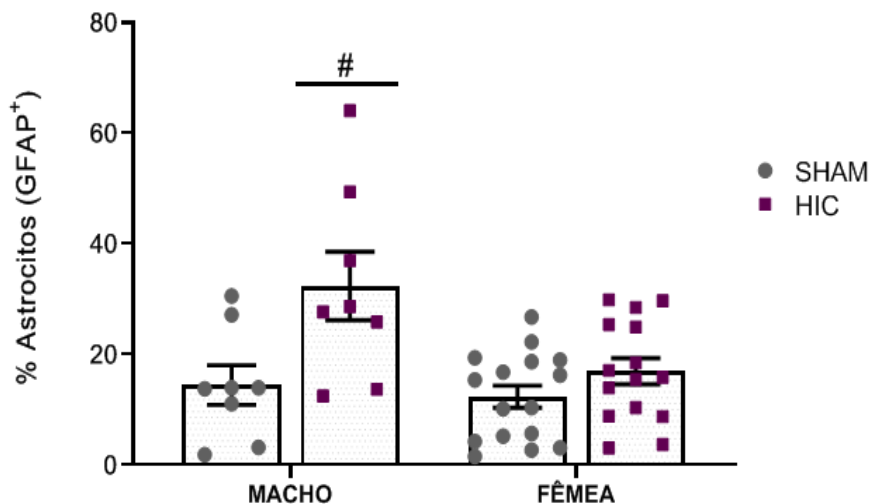


**Figura 8.** Número de neurônios em apoptose no estriado ipsilateral 72h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células NeuN(+)/ Caspase (3)+  $\pm$  EPM. n=7-8 por grupo. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas). ( $p < 0,05$ ). \*Diferença para o grupo Sham.

#### 2.4.3. Os machos HIC apresentaram uma maior proporção de astrócitos frente ao insulto

Na quantificação da proporção do número de astrócitos no estriado ipsilateral, 72 horas após a lesão (Figura 9), os machos submetidos a HIC mostraram níveis mais elevados quando comparado aos demais grupos experimentais ( $F_{(1,46)} = 4,049$ ;  $p = 0,05$ ).

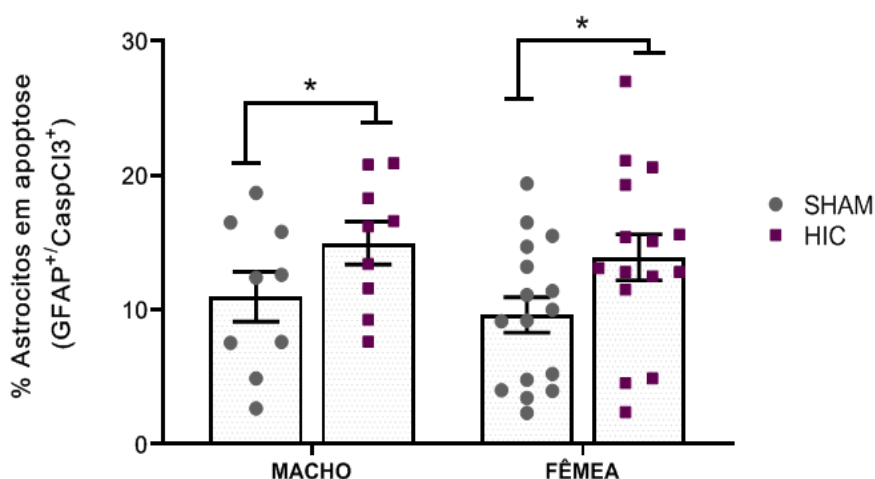




**Figura 9.** Número de astrócitos no estriado ipsilateral 72h após a lesão. Dados de citometria expressos em média de células GFAP(+)  $\pm$  EPM. n=7-8 por grupo. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas. ( $p < 0,05$ ). # Diferença para os demais grupos.

#### 2.4.4. Machos e fêmeas HIC apresentaram uma maior proporção de astrócitos em apoptose após 72 horas

Tanto machos quanto fêmeas do grupo HIC, apresentaram uma maior proporção de astrócitos em apoptose quando comparados aos seus respectivos grupos sham, na quantificação do estriado ipsilateral ( $F_{(1,48)} = 5,992$ ,  $p = 0,018$ ) (Figura 10).

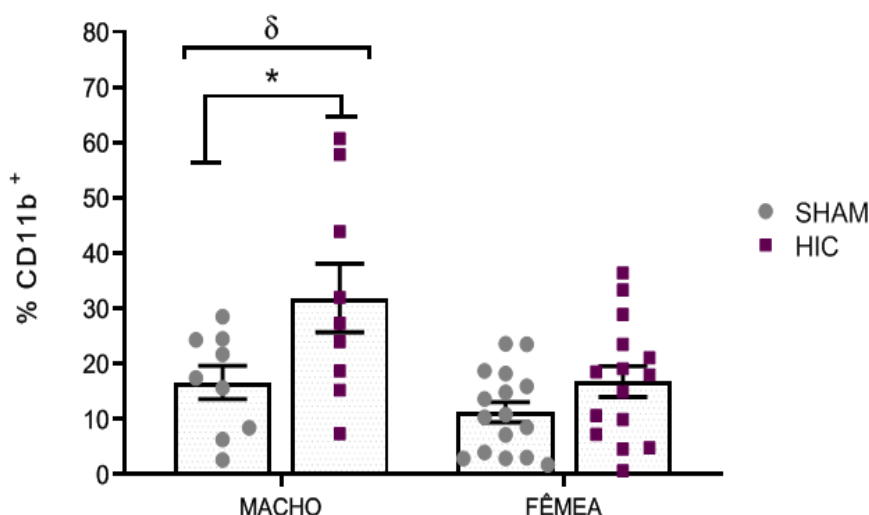


**Figura 10.** Número de astrócitos em apoptose no estriado ipsilateral 72h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células GFAP(+)/ Caspase 3(+)  $\pm$  EPM. n=7-8 por grupo. ANOVA de

duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas. ( $p < 0,05$ ). \*Diferença para o grupo Sham.

#### 2.4.5. Os machos apresentaram uma maior proporção de células microgliciais/macrófagos quando comparados a fêmeas, independente da lesão

Houve um efeito do sexo no número de células microgliciais/macrófagos, na região do estriado ipsilateral ( $F_{(1,48)} = 9,278$ ,  $p = 0,004$ ), indicando que os machos apresentam uma maior proporção desse tipo celular quando comparado as fêmeas, independente de lesão. Além disso, observou-se uma redução no número de células da microgliciais/macrófagos 72 horas após a HIC, evidenciando o efeito da lesão ( $F_{(1,48)} = 10,680$ ,  $p = 0,002$ ), como representado na Figura 11.

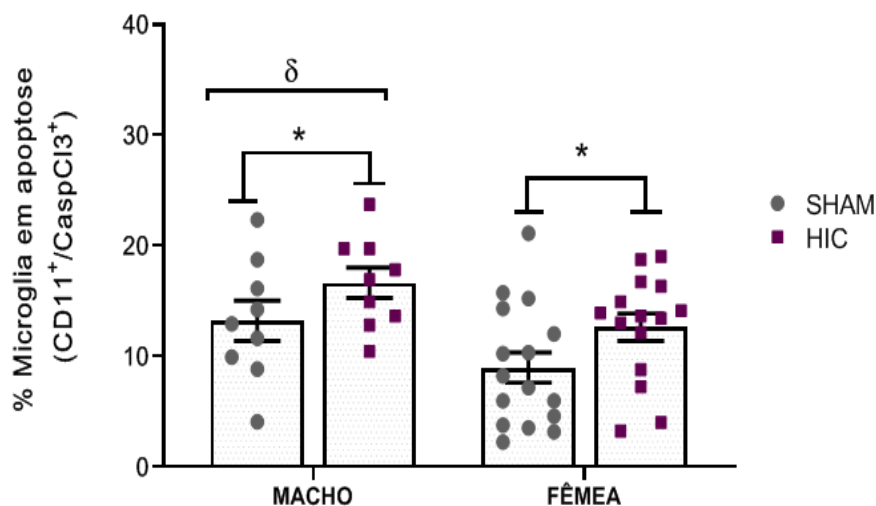


**Figura 11.** Número de células microgliciais no estriado ipsilateral 72h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células CD11b(+) ± EPM.  $n = 7-8$  por grupo. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas. ( $p < 0,05$ ). \*Diferença para o grupo Sham, δ Diferença entre os sexos.

#### 2.4.6. Os machos apresentaram uma maior morte de células da microglia quando comparados às fêmeas

A citometria realizada no estriado ipsilateral à lesão 72 horas após a HIC mostrou que existem diferenças na proporção de células microgliciais em apoptose nos grupos HIC ( $F_{(1,48)} = 5,575$ ;  $p = 0,023$ ). Também foi possível observar o efeito dos sexos, onde os grupos machos tiveram uma maior proporção de células microgliciais em

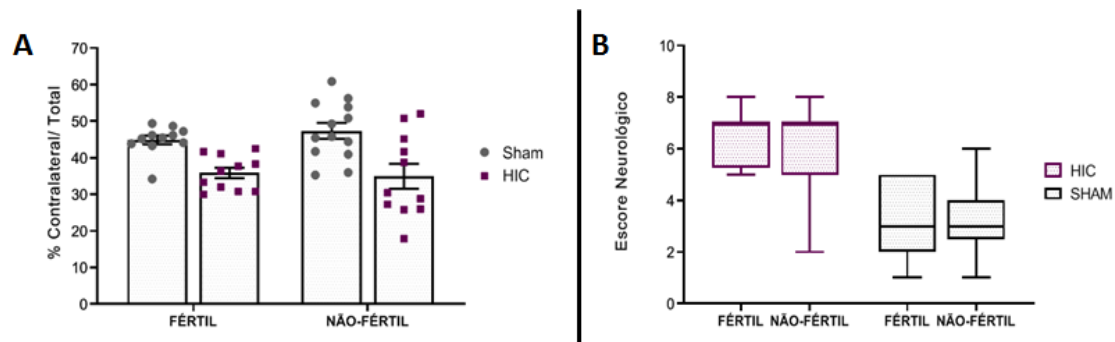
apoptose, quando comparados aos grupos fêmeas ( $F_{(1,48)} = 7,562$ ;  $p = 0,009$ ), ilustrado na Figura 12.



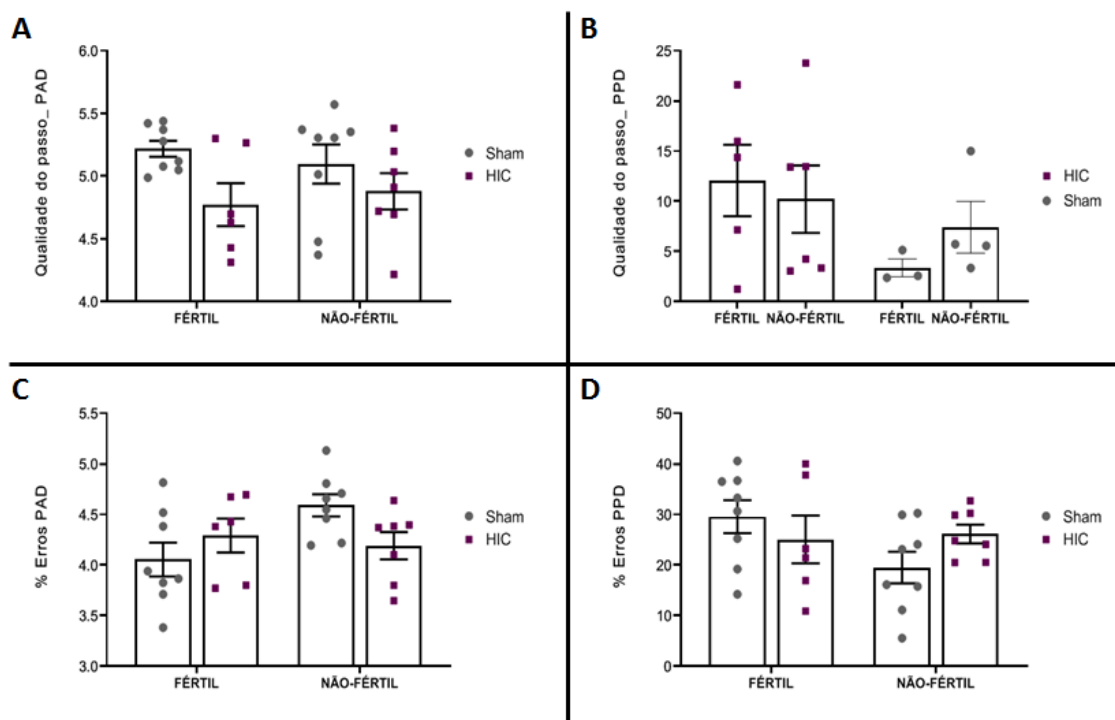
**Figura 12.** Número de células microgliais em apoptose no estriado ipsilateral 72h após a lesão. - Dados de citometria expressos em média de células CD11b<sup>+</sup>/Caspase 3<sup>+</sup> ± EPM. n=7-8 por grupo. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas. ( $p < 0,05$ ). \*Diferença para o grupo Sham, δ Diferença entre os sexos.

## 2.5. INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL

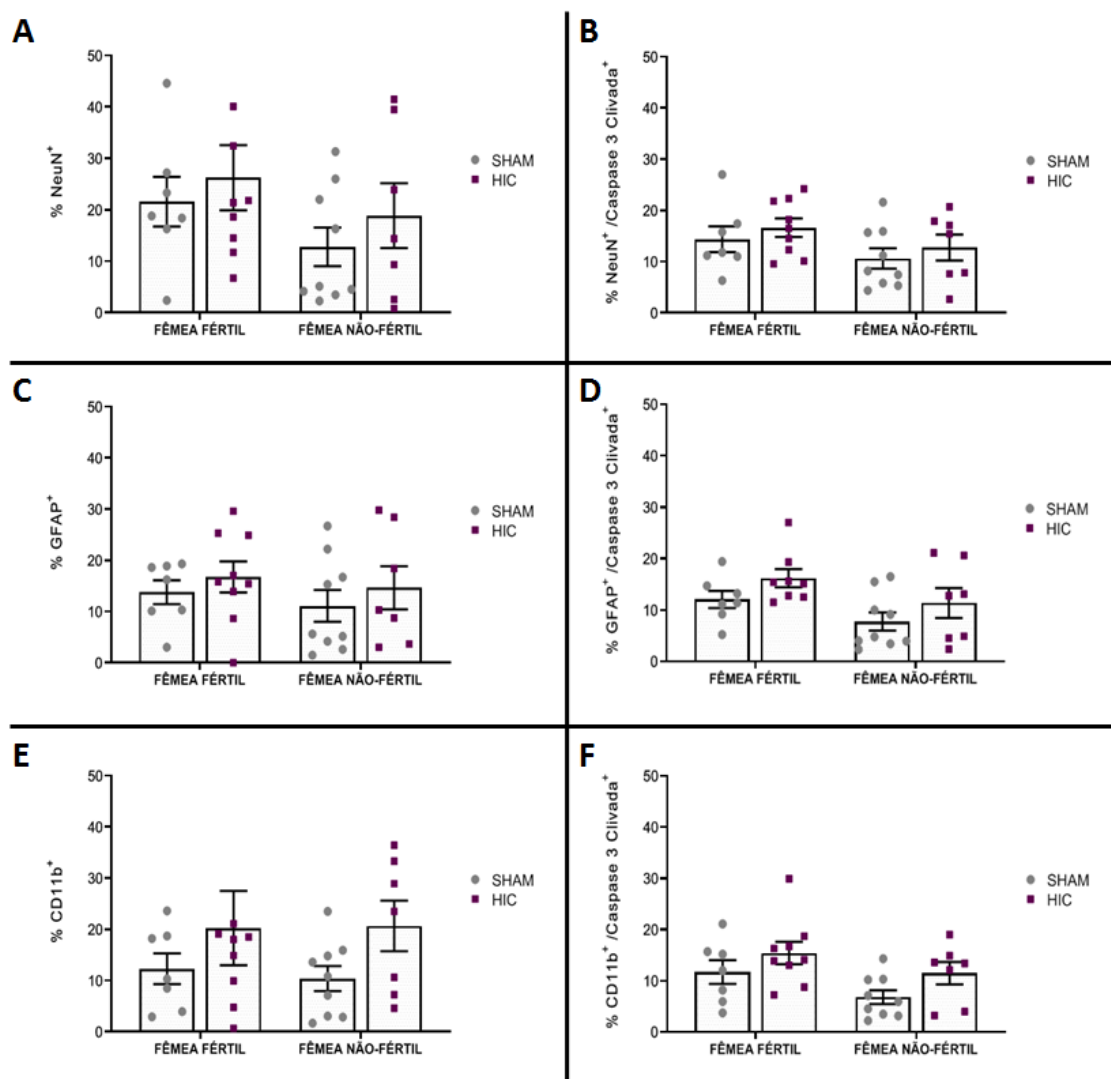
Considerando a possível influência dos hormônios na resposta comportamental e bioquímica após a HIC. Visou-se determinar possíveis diferenças entre as ratas fêmeas segundo o seu ciclo estral. Assim, foi realizada uma segunda análise dos dados usando como fatores fixos a lesão e o ciclo estral em que se encontravam as ratas fêmeas. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as fêmeas em estado fértil e não fértil tanto do grupo Sham como HIC, na análise dos testes comportamentais (Figuras 13 e 14), nem nas análises bioquímicas por citometria de fluxo (Figura 15).



**Figura 13.** Avaliação comparando a influência do ciclo estral na assimetria das patas (A). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e ciclo estral), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan,  $p < 0.05$ . Avaliação do efeito do ciclo estral sobre o escore neurológico (B). Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (p25 e p75) Teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Avaliação da qualidade do passo no teste da escada horizontal na pata anterior direita (A) e na pata posterior direita (B), bem como avaliação do percentual de erros na pata anterior direita (C) e na pata posterior direita (D). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e ciclo estral), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan, ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** Avaliação por citometria do número de neurônios (NeuN+) (A); neurônios em apoptose (NeuN+ e caspase 3+) (B); astrócitos (GFAP+) (C); astrócitos em apoptose (GFAP+ e caspase 3+) (D); microglia/macrófagos (CD11b+) (E); e microglia/macrófagos em apoptose (CD11b+ e caspase 3+) (F). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e ciclo estral), seguido do teste de comparações múltiplas Duncan, ( $p < 0.05$ ).

### 3. DISCUSSÃO

Atualmente, se faz necessário ter uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das doenças que não possuem um tratamento definitivo, como a hemorragia intracerebral (HIC). Assim é relevante que o conhecimento disponível seja considerado nas pesquisas experimentais e clínicas visando desenvolver tratamentos, que ficariam mais perto de reduzir o dano no tecido encefálico bem como melhorar o

prognóstico a curto e longo prazo dos pacientes acometidos. Tratamentos específicos para homens e mulheres se fazem necessários, considerando respostas sexo-específicas à lesão cerebral. De maneira sucinta, neste trabalho de conclusão de curso, demonstramos que os machos apresentam uma maior vulnerabilidade à HIC em parâmetros comportamentais e moleculares. Além disso, evidenciamos que as fêmeas não apresentaram maior ou menor prejuízo na função sensório-motora na morte celular nem na expressão das células gliais, após a HIC, considerando as diferentes fases do ciclo estral.

Durante a HIC, o extravazamento sanguíneo para dentro do parênquima cerebral leva a uma significativa morte celular por necrose, apoptose e autofagia (Keep; Hua; Xi, 2012), que pode ser resultado da compressão mecânica durante a formação do edema, bem como dos componentes do coágulo e produtos de degradação do sangue (Neves, 2015). Em paralelo, outros pesquisadores creem que a neurodegeneração vista após a HIC, pode ser resultado da apoptose devido a toxicidade gerada pela degradação do hematoma, assim como da ativação de células inflamatórias que passam a se acumular horas depois do insulto (Wasserman; Schlichter, 2007; Xue; Del Bigio, 2001). Modelos experimentais de HIC induzida por colagenase demonstraram o aumento de células apoptóticas no interior e ao redor da lesão hemorrágica, atribuindo-as com neurônios e astrócitos (Matsushita et al., 2000). Algo parecido é visto em humanos, onde observou-se neurônios apoptóticos, especialmente na periferia do hematoma (Qureshi et al, 2003a), embora ainda não está claro o quanto influencia o dano encefálico pela apoptose celular na região ao redor do hematoma. Neste trabalho, mostramos que houve um aumento no número de neurônios em processo de apoptose após a lesão em ambos os sexos. Isso pode ser uma das possíveis causa do maior dano motor e neurológico dos grupos HIC. Uma vez que machos e fêmeas tiveram proporções de neurônios em apoptose semelhantes, este achado sugere que a morte neuronal e, conseqüentemente uma menor quantidade de neurônios, não são as únicas responsáveis pelo déficit comportamental mais grave observado em machos. Fez-se necessário avaliar outros tipos de morte celular, como por necrose.

A microglia suporta uma linha importante de defesa contra germes invasores, trauma, isquemia, doenças neurodegenerativas ou atividades neuronais alteradas que indiquem perigo potencial ou real (Block et al, 2007; Colton, 2010; Davoust et al., 2008; Graeber; Streit., 2010; Hanisch; Kettenmann, 2007). Na detecção de uma lesão,

as células microgлияis alteram sua morfologia, a expressão gênica e o comportamento funcional sofrendo uma mudança definida como ativação microgлияl. Após a HIC, a resolução do hematoma é de suma importância para obter-se um prognóstico positivo e uma melhora funcional, sendo essas microgлияs as responsáveis por essa limpeza (Neves, 2015). Horas após a lesão, a microgлия ativada engolfa os componentes do hematoma liberando grandes quantidades de produtos pró-oxidantes e citocinas inflamatórias que promovem a lesão neuronal e morte celular (Hanisch; Kettenmann, 2007; Splettstoesser; Schuff-Werner, 2002; Woo et al., 2012; Zhao et al., 2007). No entanto, a infiltração de macrófagos derivados do sangue periférico só começa 5 dias após a HIC (Mackenzie; Clayton, 1999; Schilling et al., 2003).

O aumento de células macrofágicas/microgлияis no estriado, indicam reatividade microgлияl e uma possível resposta inflamatória mediada pela microgлия (Neves, 2015). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os machos apresentam uma maior proporção deste tipo de células quando comparado as fêmeas, facilitando que um maior número de macrófagos e microgлия residente no encéfalo participe na resposta inflamatória após a HIC. O sangue extravazado para o parênquima cerebral leva à deformação do tecido neuronal e dispara uma resposta inflamatória após a HIC (Aronowski; Hall, 2005; Xue; Del Bigio, 2000), como a liberação de citocinas e óxido nítrico (Chao et al., 1993; Hunter et al., 2007). Essa diferença no número de células inflamatórias, poderia desencadear uma cascata de eventos mais exacerbada nos machos e explicar em parte os déficits comportamentais com uma resposta sexo-específica.

Sabe-se que na HIC, a sintomatologia das primeiras horas como, hemiparesia, distúrbio da consciência e desorientação, são causadas pela destruição tecidual cerebral, e do efeito de massa, que é gerado pelo aumento do hematoma e edema cerebral (Daverat et al., 1991.) Os efeitos do dano primário produzem morte neuronal imediata pela compressão neural, mas grande parte das sequelas observadas após a lesão hemorrágica são causadas pelos produtos de coagulação do sangue e degradação da hemoglobina provocando uma piora do quadro neurológico (Aronowski; Zhao, 2011; Qureshi; Mendelow; Hanley, 2009). O estriado tem um importante papel na função motora, regulando a iniciação do comportamento motor e influenciando padrões de movimento (Squire et al., 2008). A lesão hemorrágica se desenvolve durante um período de até 7 dias após a HIC (Neves, 2015). Diversos trabalhos mostram que o modelo de HIC leva à piora do quadro neurológico, gerando um déficit no uso assimétrico dos

membros anteriores (Auriat; Colbourne, 2009; Clarke et al., 2005; Debow et al, 2003; Hartman et al.,, 2009). Os achados no teste do cilindro estão em concordância com a literatura, evidenciando uma assimetria na pata anterior á lesão, a qual poderia assemelhar em certa forma a hemiparesia que induzida pela HIC. O grupo HIC macho foi o mais afetado, sendo o grupo com menor quantidade de toques com a pata dianteira contralateral a lesão. Isso mostra que esse tipo de sequela pode ser mais grave no sexo masculino, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer o mecanismo envolvido.

Através do teste da escada horizontal também foi possível mostrar o comprometimento na coordenação e habilidade de marcha dos animais. Destaca-se que a HIC promoveu um comprometimento na coordenação na marcha , bem como o déficit motor que levou a um maior número de erros com a pata anterior contralateral a lesão, mostrando o comprometimento deste membro.

Nosso trabalho também buscou averiguar se a fase do ciclo estral poderia influenciar a resposta à HIC, considerando que a literatura não é conclusiva a respeito. No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas entre a fase fértil e não fértil das ratas. Uma possível explicação para essa hipótese foi ter considerado apenas a fase do ciclo estral no momento da lesão para as análises dos diversos desfechos. Outro aspecto poderia estar relacionado com o agrupamento dos ciclos, em duas fases: a fase fértil, onde as fases proestro e estro foram agrupadas; seguida pela fase não-fértil com as fases de metaestro e diestro. Esse agrupamento poderia dificultar um controle mais preciso do ciclo e seria necessário um número maior de animais, a fim de estabelecer possíveis diferenças. Embora a literatura mostra os efeitos neuroprotetores dos hormônios femininos, nosso trabalho não achou diferenças que corroborassem essa informação. Isso não exclui o fato que os hormônios femininos influenciam em um melhor prognóstico, mas sim que melhores formas metodológicas devem ser padronizadas para que de fato, possa haver um controle maior sobre essa variável biológica.

Este é um dos primeiros trabalhos a mostrar os possíveis efeitos do sexo frente ao insulto hemorrágico encefálico, colocando machos e fêmeas sobre as mesmas condições e parâmetros. Nosso trabalho demonstrou que os machos apresentam maior comprometimento motor no membro superior contralateral à lesão frente às fêmeas. Isso talvez possa ser explicado pelas respostas celulares mais exacerbadas como um maior



número de astrócitos e micróglia no estriado ipsilateral à lesão. Mesmo sendo necessários mais estudos para elucidar melhor as diferentes respostas sexo-específicas e suas influências sobre a HIC, nossos achados abrem uma oportunidade sobre alvos terapêuticos já conhecidos como astrócitos e microglia, mas de maneira que futuros possíveis tratamentos para a HIC, possam ser realizados de forma mais distinta para homens e mulheres, e dessa forma, obter-se melhores desfechos. Ainda são necessários mais estudos a respeito, uma vez que é cada vez mais frequente a necessidade de se realizar estudos utilizando ambos os sexos, já que existe densa literatura sobre as diferenças nas respostas fisiopatológicas entre os sexos nas mais diversas patologias.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ASPECTOS ÉTICOS**

Os procedimentos realizados no presente trabalho de conclusão de curso estão de acordo com a lei nº 11,794 de 8 de outubro de 2008, bem como as diretrizes do CONCEA e os Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences* [CIOMS] NIH publication 85-23, 1985).

Do mesmo modo, foram providos todos os cuidados necessários pré e pós-cirurgia, e os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número 36929.

### **4.2. ANIMAIS**

Ratos *Wistar* de ambos os sexos foram obtidos do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos com alimentação padrão e água *ad libitum*, e ciclos de 12h claro e escuro em salas climatizadas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Os animais passaram por uma manipulação prévia juntamente aos pesquisadores envolvidos de modo a reduzir o estresse dos animais ao longo dos experimentos.

Ratos *Wistar* machos adultos (n=48) e fêmeas (n=84) com 3 meses de idade, pesando 300-350g e 200-250g, respectivamente, foram alojados em grupos de 4-5 (de acordo com o peso dos animais, em gaiolas Plexiglas em condições padrões de laboratório. Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, sendo eles: macho sham, macho HIC, fêmea sham fértil, fêmea HIC fértil, fêmea sham não-fértil e fêmea HIC não-fértil. Foi optado a fazer apenas grupos sham como controle para comprovação de ausência de lesão pelo método cirúrgico, uma vez que, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa não demonstraram diferenças significativas entre os grupos sham e naive, e visando reduzir o número de animais a serem utilizados.

Para avaliar o ciclo estral das ratas fêmeas, foi coletado o esfregaço vaginal, com o auxílio de uma pipeta de 200 $\mu$ L com a colocação de salina estéril para realização do lavado vaginal. Em seguida, esse lavado foi colocado em lâminas histológicas devidamente identificadas, analisadas por microscopia e registrados ao longo do tempo. A coleta do esfregaço vaginal para a avaliação do ciclo estral das ratas foi realizada nos dias 7 e 14 prévios a cirurgia, imediatamente antes do procedimento de HIC e logo após os testes comportamentais. As duas primeiras coletas foram realizadas a fim de acompanhar o ciclo dos animais, a terceira com o intuito de estabelecer possíveis associações com a severidade da lesão e a última avaliação para determinar possíveis interferências no desempenho comportamental. As fêmeas foram divididas em duas fases do ciclo: Fértil, sendo aquelas ratas que se encontravam nas fases de proestro e estro; e Não-Fértil, para as fases metaestro e diestro, conforme descrito na Figura 4.

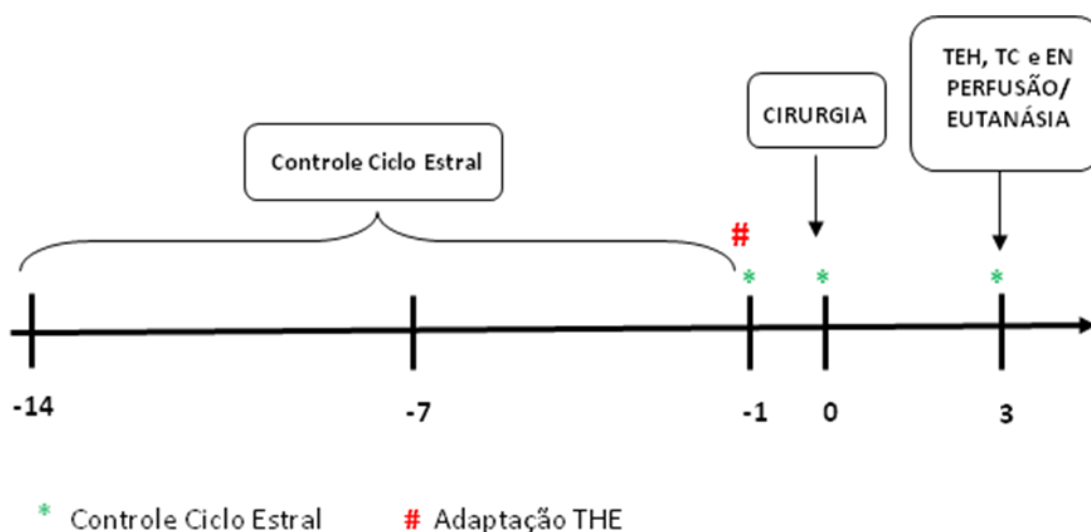


Figura 16. Desenho experimental. TEH= Teste da escada horizontal; TC Teste do cilindro; EN= Escore neurológico.

### **4.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

O modelo de AVE hemorrágico experimental com o uso de colagenase está bem descrito na literatura, sendo um dos que melhor mimetiza o que é encontrado na clínica (Mestriner et al, 2011; 2013; Neves, 2015). Para mimetizar a HIC, os animais foram anestesiados previamente com 4% de halotano em 30% de oxigênio e 70% de óxido nitroso e, mantidos em um aparato esterotáxico com halotano a 2%. Os animais foram tricotomizados na região da cabeça. Em seguida, foi feita uma incisão na linha média do escalpo (entre as marcações do Bregma e Lambda). Com base no Bregma de cada animal, foram calculadas as coordenadas estereotáxicas (Paxinos e Watson) sendo marcado o ponto 3,6mm lateral ao Bregma no lado esquerdo. Em seguida, foi utilizada uma broca de dentista para a perfuração do crânio do animal na região previamente marcada. Uma vez que se teve acesso ao cérebro do animal, uma agulha de calibre 26 (Hamilton, Reno, NV, USA) foi inserida à 6,0mm de profundidade na abertura onde, para os animais sham foi injetada 0,5µL de salina estéril 0,9% e para os animais HIC, foi injetada 0,2U de colagenase bacteriana tipo IVs (Sigma-Aldrich, USA) diluída em 1,0µL de salina (MacLellan; Gyawalig; Colbourne, 2006; MacLellan et al., 2008; Rosemberg et al., 1990; Szymanska et al., 2006). Em ambas as administrações, os volumes foram infundidos por um período de 3 minutos, e a seringa permaneceu na mesma posição durante 3 minutos adicionais sendo removida lentamente para evitar o refluxo das substâncias (Neves, 2015). Essas coordenadas foram calculadas visando afetar o estriado destes animais, gerando prejuízos cognitivos, mas principalmente motores. Foi controlada a temperatura dos animais entre 36,5°C e 37,5°C durante o período cirúrgico, com a utilização de um cobertor de aquecimento auto-regulável (Letica, Espanha). Neste estudo, 23% dos machos e 23 % das fêmeas morreram devido a complicações da cirurgia/lesão em até 24 horas após o procedimento cirúrgico.

### **4.4. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL**

#### **4.4.1. TESTE DO CILINDRO**

O teste do cilindro teve como objetivo avaliar o uso assimétrico dos membros anteriores durante a realização de uma tarefa exploratória e suporte corporal (Woodlee et al., 2005; Maclellan et al., 2006; Auriat et al., 2006). Os animais foram colocados dentro de um cilindro de acrílico, com dimensões de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, colocado sob uma mesa com tampo de vidro a fim de facilitar a visualização das patas anteriores do animal. Em seguida, os animais foram filmados individualmente por um período de 3 minutos. Previamente estabelecido, animais com menos de 10 contatos exploratórios foram excluídos do teste, já que poderia não haver uma representatividade fidedigna no uso das patas pelo baixo número de contatos. Embora a literatura seja um pouco divergente sobre a adaptação dos animais para este teste, foi também estabelecido que não haveria uma adaptação dos animais ao aparato, tendo em vista que poderia haver um viés, gerado pelo “conhecimento” destes animais ao aparato e o mesmo deixaria de ser uma novidade, gerando uma menor indução de exploração do ambiente por parte do animal, comprometendo o número de contatos.

Para a quantificação do uso assimétrico dos membros anteriores, a gravação do vídeo de cada animal foi analisada através do software VLC Media Player®, com uma redução de velocidade de 50%, de forma que pudesse ser contabilizado o número de toques das patas anteriores dos animais. O uso do membro anterior foi definido através da colocação de toda a palma na parede o que indica a sua utilização para o apoio do corpo. A análise foi realizada por um avaliador cego quanto aos grupos experimentais e o escore foi obtido através da seguinte fórmula:  $(\text{contatos realizados com o membro anterior contralateral} / \text{número total dos contatos realizados com ambos os membros anteriores} \times 100)$  (Maclellan et al., 2006; Auriat et al., 2006).

#### **4.4.2. TESTE DA ESCADA HORIZONTAL**

O teste da escada horizontal tem como objetivo avaliar a habilidade e coordenação na execução da marcha através da avaliação dos erros de colocação dos membros anteriores e posteriores (Metz e Whishaw, 2002). O aparato (escada horizontal) consiste em duas paredes de acrílico transparente com dimensões de 1 m de comprimento e 20 cm de altura, e traves de metal, cada uma com 3 mm de diâmetro que serão inseridas na parte inferior das paredes de acrílico. A escada permaneceu elevada

30 cm do solo, existindo um refúgio escuro (caixa preta) para o animal ao final da sua extensão.

A distância entre as paredes sempre foi ajustada previamente de acordo com o tamanho do animal, de maneira que levasse o animal a seguir sempre em frente, evitando que ele caminhe em torno de si ou vire-se no sentido contrário ao teste (Metz e Whishaw, 2002). A dificuldade do teste foi determinada pelo padrão de colocação das traves, podendo ser regular ou irregular. No padrão regular as traves foram espaçadas em intervalos de dois centímetros, sendo utilizado na sessão de adaptação, um dia antes da cirurgia. Enquanto no padrão irregular, utilizado na avaliação 72h, as traves foram espaçadas em intervalos de um a cinco centímetros, usando 3 protocolos de distribuição das traves ao longo do aparato. Todos os animais foram colocados em uma extremidade da escada e tiveram a possibilidade de andar em direção à outra extremidade da escada durante três vezes.

Vinte e quatro horas antes da cirurgia os animais passaram por uma adaptação no aparato, sendo feitas 3 travessias com intervalos regulares entre as traves. No dia do teste, as travessias dos animais no aparato foram filmadas, de modo a capturar as 4 patas, para posterior análise e mensuração do desempenho. O escore final foi dada pela análise da qualidade do passo da pata dianteira contralateral à lesão, assim como o número de erros também com a para contralateral à lesão expressa em percentual de erros, das patas anterior e posteriores (Maclellan et al, 2006; Metz e Whishaw, 2002).

#### **4.4.3. ESCORE NEUROLÓGICO**

O escore neurológico tem como objetivo avaliar a função motora geral por meio do movimento de rotação ipsilateral espontânea do animal e a habilidade locomotora. Para a observação da rotação ipsilateral espontânea, os animais foram suspensos pela cauda por um período de 10 segundos, sendo pontuada de 0 a 4 pontos, onde 0 foi considerado em ausência de rotação e 4 um grau severo, onde o animal realiza uma rotação ipsilateral contínua.

Para a avaliação da habilidade motora, os animais foram desafiados a atravessar uma viga de madeira com 2 cm de largura e 1,5m de distância com uma caixa preta ao final da viga. Nesta etapa os animais também foram avaliados de 0 a 4 pontos onde, 0

foi uma caminhada sem qualquer dificuldade e 4 quando o animal não conseguia permanecer na viga por pelo menos 10 segundos. Uma informação detalhada sobre ambos os testes está descrito na tabela 1. O escore de ambos os testes foram somados para gerar uma pontuação geral do desempenho motor dos animais.

Tabela 2. Descrição da pontuação esperada do escore neurológico de acordo com a ação do animal.

ESCORE	ROTAÇÃO IPSILATERAL ESPONTÂNEA	HABILIDADE DE LOCOMOÇÃO NA VIGA
0	<i>Normal:</i> Rotação simétrica	<i>Normal:</i> Normalmente caminha até a caixa preta
1	<i>Leve:</i> uma tendência a rotação ipsilateral	<i>Leve:</i> pequena disfunção com uma passada mais longa ou uma caminhada desequilibrada
2	<i>Brando:</i> Rotação ipsilateral com voltas contralaterais ocasionais	<i>Brando:</i> Erros frequentes do membro anterior
3	<i>Moderado:</i> Rotação ipsilateral frequente sem rotação contralateral	<i>Moderado:</i> Inabilidade de caminhar sob a viga
4	<i>Severo:</i> Rotação ipsilateral contínua	<i>Severo:</i> Queda da viga dentro de 10 segundos

## 4.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA

### 4.5.1. PERFUSÃO

Para a preservação das estruturas de interesse, 72 horas após a indução da lesão, os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano inalatório. Em seguida os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com uma solução salina na concentração de 0,9%, para a lavagem vascular e, posteriormente, uma solução fixadora de paraformaldeído na concentração de 4% diluída em tampão fosfato 0,2M e pH na faixa de 7,4. Os encéfalos foram removidos e mantidos na mesma solução fixadora por 24 h para pós-fixação.

Após esse período, os encéfalos foram colocados em vials contendo uma solução de sacarose 15% por 48 horas, seguido de sacarose 30% por mais 24 horas. As amostras foram crioprotetidas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido na faixa entre -25 e -30°C e mantidas sob temperatura de -20°C, até posterior corte no criostato e análise histológico.

### 4.5.2. CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise celular de neurônios, astrócitos e microglia, o estriado ipsilateral a lesão foi dissociado em PBS, e em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1% de PBS Triton X-100 por 10 minutos à temperatura ambiente, bloqueadas por 15 min com 3% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich - A2153). Após o bloqueio, foram incubadas com os anticorpos primários, para neurônio NeuN + (Sigma Aldrich - ABN78C3) astrócito GFAP+ (Sigma Aldrich - G3893) e microglia CD11b+ (Millipore - CBL1512) na concentração final de 1:100 e incubadas à temperatura ambiente por 2h. Após, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 1h com anticorpo secundário IgG Alexa Fluor-633 anti-coelho, IgG Alexa-Fluor 488 anti-camundongo ou IgG Alexa-Fluor 488 anti-cabra, na concentração final 1:200. Os controles negativos ( amostras com o anticorpo secundário) foram incluídos para configurar as tensões da máquina e para determinar a região negativa do gráfico de pontos. A emissão de fluorocromos foi calibrada em: vermelho (FL-4; 670 nm), amarelo (FL-2; 578nm) e verde (FL-1; 488 nm). 10.000 eventos (células intactas) foram adquiridos no estriado. O número de células foi determinado após a exclusão dos detritos (Heimfarth et al., 2013). Todas as aquisições foram realizadas por meio do equipamento FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) para posterior análise no programa Flow Jo v10.1 (Weis et al., 2012).

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* SPSS para Windows, versão 21 e os gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prism8. A distribuição normal dos dados foi estabelecida por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para os dados paramétricos foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando os desfechos como fatores fixos (lesão e sexo dos animais), seguido do teste de comparações múltiplas quando diferenças significativas foram encontradas. Para diferenças entre as fêmeas segundo o ciclo estral os fatores fixos foram lesão e ciclo. Os dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* Dunn para múltiplas comparações. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (EPM). O valor de significância aceito foi  $p \leq 0,05$ .

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças ao suporte da equipe do laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção da UFRGS, e pelo apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, M. M., Fisiologia. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999.
- Aronowski J.; Hall C.E. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies. *Neurol Research*, v. 27, p. 268-279, 2005.
- Auriat A.M. et al. Delayed rehabilitation lessens brain injury and improves recovery after intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Research*, v. 1251, p. 262-268, 2009.
- Auriat A.M.; Grams J.;D.; Yan R.H.; Colbourne F. Forced exercise does not improve recovery after hemorrhagic stroke in rats. *Brain Resresearch*, v.1109, p. 183–191, 2006.
- Block, M. L.; Zecca, L.; Hong, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.
- Botelho et al. Epidemiologia do acidente vascular cerebral no Brasil. *Temas em Saúde*, v. 16, n. 2, p. 361-377, 2016.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Diretrizes de atenção à reabilitação da pessoa com acidente vascular cerebral / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- Brunswick A.S.; Hwang B.Y.; Appelboom G.; Hwang R.Y.; Piazza M.A.; Connolly E. S. Jr. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci*. v. 321, n. 15, p. 1-10, 2012.
- Cahill, L. & Aswad, D. Neuro View Sex Influences on the Brain: An Issue Whose Time Has Come. *Neuron*, v. 88, p. 1084-1085, 2015.
- Chao, C. C. et al. Activated microglia inhibit multiplication of toxoplasma gondii via a nitric oxide mechanism. *Clinical Immunology and immunopathology*, v. 67, n. 2, p. 178-183, 1993.
- Chao, C. C. et al. Activated microglial inhibit multiplication of Toxoplasma gondii via a



nitric oxide mechanism. *Clinical immunology and immunopathology*, v.67, n.2, p. 178-183, 1993.

Cheon S.H. The effect of a skilled reaching task on hippocampal plasticity after intracerebral hemorrhage in adult rats. *Journal of Physical Therapy Science*, v. 27, n. 1, p. 131-133, 2015.

Clarcke, J. et al. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. *Experimental neurology*, v. 191, n.1, p.119-127, 2005.

Colton, C. A.; Wilcock, D. M. Assessing activation states in microglia. *CNS & neurological disorders drug targets*, v. 9, n. 2, p. 174-191, 2010.

Daverat, P. et al., Death and functional outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage. A prospective study of 166 cases using multivariate analysis. *Stroke*, v. 22, p. 1-6, 1991.

Davoust, N. et al. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends in Immunology*, v. 29, n. 5, p. 227-234, 2008.

Debow, S. B. et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke*, v. 34, n. 4, p. 1021-1026, 2003.

Del Bigio, M.R. et al., Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke*, v. 27, n.12, p.2312-2320, 1996.

Feldmann, E. et al. Major risk for intracerebral hemorrhage in the young are modifiable. *Stroke*, p.1881-1885, 2005.

Fiorella, D., Zuckerman, S.L., Khan, I.S., Ganesh, N.K., Mocco, J. Intracerebral Hemorrhage: a common and devastating disease in need of better treatment. *World Neurosurg*, p. 1-6. 2015.

Fisher, C. Cerebral military aneurysms in hypertension. *The American Journal of Pathology*, v.66, n.2, p. 313-330, 1972.

Fisher, C. Pathological observation in hypertensive cerebral hemorrhage. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v.30, n.3, p. 536-550, 1971.

Flórez-Vargas, O. et al., Bias in the reporting of sex and age in biomedical research on mouse models. *eLIFE*, 5:pii: e13615,2016.

Graeber, M. B.; Streit, W. J. Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, v. 119, n. 1, p. 89-105, 2010.

Graham D.I., McIntosh T.K., Maxwell W.L., Nicoll J.A. Recent advances in neurotrauma. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 59, p. 641-651, 2000.

Hagber H. et al. Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria. *J.Child.Neurol.*, v. 24 n. 9, p. 1141-46, 2009.

Hanisch, U.-K.; Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, v. 10, n. 11, p. 1387-1394, 2007.

- Hanley D.F. Intraventricular hemorrhage: severity factor and treatment target in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*, v. 40, p. 1533–1538, 2009.
- Hartmann, R. et al. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Research*, v. 1280, p. 148-157, 2009.
- Hunter, C. A. et al., Astrocyte activation correlates with cytokine production in central nervous system of *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Laboratory investigation*, v.67, n.5, p.635-642,1992.
- Infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, v. 183, n. 1, p. 25-33, 2003.
- Keep, R. F.; Hua, Y.; Xi, G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. *The Lancet Neurology*, v. 11, n.8, p. 720-731, 2012.
- Kirkman MA, Allan SM, Parry-Jones AR. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *J Cereb Blood Flow Metabolism*, v. 31, p. 2135-2151, 2011.
- Koeppen, A. h.; Dickson, A. C.; Smith, J. Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit on tin-mesoporphyrin. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 63, n.6, p.587-597, 2004.
- Liu, D.Z. et al. Blood-Brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. *Annals of Neurology*, v. 67, n. 4, p. 526-533, 2010.
- Lusardi T.A.; Wolf J.A.; Putt M.E.; Smith D.H.; Meaney D.F. Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. *J Neurotrauma*, v. 21, p. 61–72, 2004.
- Mackenzie, J. M.; Clayton, J. A. Early cellular events in the penumbra of human spontaneous intracerebral hemorrhage. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1999.
- MacLellan et al. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for pytoprotection studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 26, n. 8, p. 1031-1042, 2006.
- Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J.; Tanno, A. P. Determination Of The Estrous Cycle Phases Of Rats: Some Helpful Considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v.62, n. 4a, nov. 2002.
- Matsushita, K. et al. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, v. 20, n.2, p. 396-404, 2010.
- Mayer, S. A.; Rincon, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurology*, v.4, n.10, p. 662-672, 2005.
- Nakamura, T. et al. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Research*, v.1039, n.1-2, p.30-36, 2005.
- Nelson, R. J. *An Introduction to Behavioral Endocrinology*, Third Edition, 2005.

- Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6<sup>th</sup> ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, Elsevier. 2007.
- Qureshi A.I.; Mendelow A.D.; Hanley D.F. Intracerebral haemorrhage. *Lancet*, v. 373, p. 1632-1644, 2009.
- Qureshi A.I.; Suri M.F.; Ostrow P.T. et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*, v. 52, p. 1041–1047, 2003a.
- Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med.*, v. 31, p. 1482–1489, 2003b.
- Rosemberg, G. et al. Collagenase-indeuced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*, v.21, n.5, p. 801-807, 1990.
- Saúde Brasil: Uma análise da situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas, 2018.
- Schilling, M. et al. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, v. 183, n. 1, p. 25-33, 2003.
- Simpson, J. & Kelly, J. P. The impact os environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural. Brain Research*, v. 222, p. 246-264, 2011.
- Splettstoesser, W. D.; Schuff-Werner, P. Oxidative stress in phagocytes-“the enemy within”. *Microscopy research and technique*, v. 57, n. 6, p. 441-455, 2002.
- Squire, L. R. et al. *Fundamental Neuroscience*. Third edit, San Diego, Califórnia: Academica Press, 2008.
- Thrift, G.; Donnan, G.; McNeil, J. Epidemiology of intracerebral hemorrhage. *Epidemiologic Reviews*, v. 17, n.2, p.361-381, 1995.
- Valente, F. C. S. et al. Pesquisas e ensinios: considerações e reflexões. *Revista do Curso de Letras da UNIABEL. Nilópolis*, v. I, n. 2, 2010.
- Wagner, K. R.; Sharp F. R.; Ardizzone T. D.; Lu A.; Clark J.F. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolism*, v. 23, p. 629–652, 2003.
- Wasserman, J. K.; Schlichter, L. C. Neuron death and inflammation in a rat model of intracerebral hemorrhage: Effects of delayed minocycline treatment. *Brain Research*, v. 1136, n.1, p. 208-218, 2007.
- Whishaw I.Q.; Oconnor W.T. et al. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain*, v. 109, p. 805-843, 1986.
- Woo, M. S. et al. Genetic deletion of CD36 enhances injury after acute neonatal stroke. *Annals of Neurology*, v. 72, n. 6, p. 961-970, 2012.
- Wu, J. et al. Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage. *Stroke*, v. 34, n. 12, p. 2964-2969, 2003.

Xi G.; Keep R.F.; Hoff J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol.* v. 5, p. 53–63, 2006.

Xue, M.; Del Bigio Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: Time course of inflammation and cell death. *Neuroscience Letters*, v. 283, n.3, p. 230-232, 2000.

Yang, Y. et al. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, v. 26, n.12, p. 1490-1495, 2006.

Zhao, X. et al. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: Role for peroxisome proliferator-activated receptor in microglia/macrophages. *Annals of Neurology*, v. 61, n. 4, p. 352-362, 2007.

## ANEXO 1

Normas para publicação da Revista “*Brain Research*”.

### Submission

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

### Submit your article

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

### Peer review

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

### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate

words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

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

## 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. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

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

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

## 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

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

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

### Keywords

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

### Abbreviations

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

### Acknowledgements

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

### Formatting of funding sources

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

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

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university,



college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

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

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

### Units

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

### Minimal Data Standards

Resources reported in neuroscience articles often lack sufficient detail to enable reproducibility or reuse. To facilitate resource identification in the neuroscience literature, we recommend to include relevant accession numbers and identifiers in your article, which will be converted into links to corresponding data repositories and embedded enrichments once the article is published and appears on SciencDirect. Please consider inclusion of GenBank accession numbers, antibody identifiers, species specific nomenclatures, and software identifiers in the method section of your article. The complete set of recommendations with detailed instructions is available at: <https://www.elsevier.com/about/content-innovation/minimal-data-standards>

### Artwork

#### Electronic artwork

#### General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

#### Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

#### Color artwork

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

#### Figure captions

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

#### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## 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 highly encouraged.

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

### Web references

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

## Data references

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

## References in a special issue

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

## Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/brain-research>

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

## Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or 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 can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... 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. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

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

### Journal abbreviations source

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

### Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Data visualization

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

### Supplementary material

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

### Research data

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

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

### Data linking

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

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

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

### Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are

encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

#### Data statement

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

#### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

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

#### Offprints

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