

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Comparação da sensibilidade de técnicas que avaliam dano celular induzido por  
diferentes tipos de insultos em células astrogliais

JÉSSICA HAUSCHILD TADAY

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Comparação da sensibilidade de técnicas que avaliam dano celular induzido por diferentes tipos de insultos em células astrogliais

Trabalho apresentado como  
requisito parcial para aprovação na  
Disciplina de Trabalho de Conclusão do  
Curso de Farmácia da Universidade Federal

JÉSSICA HAUSCHILD TADAY

Orientadora: Prof. Marina Concli Leite

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2017

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Dulce, por todo incentivo e apoio, sem vocês nada disso teria sido possível. Amo vocês!

Ao meu irmão, Jeferson, minha cunhada, Bruna, e ao Dudu, pela torcida. Vocês são muito especiais para mim!

Ao meu afilhado, Davi, por todos os momentos de alegria, amor e carinho. Amo você!

A toda minha família por sempre me incentivar a estudar, muito obrigada!

A minha amiga Letícia, obrigada por estar sempre comigo me incentivando e apoiando, tua amizade é muito importante pra mim!

A minha orientadora Marina por acreditar em mim, por todos ensinamentos, pela incansável ajuda e dedicação e pela amizade. És um exemplo de profissional e de pessoa. Obrigada por tudo!

A Fafá e a Marina S. por toda ajuda e ensinamentos durante este trabalho. Foi um prazer trabalhar com vocês!

A todos do laboratório 31M, Fe, Carol, Gabriel, Jeh, Joanne e Fran, muito obrigada pelos momentos de aprendizado e de descontração compartilhados.

A todos do laboratório 33 pela amizade, essa parceria com certeza facilita muito o trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fapergs.

## APRESENTAÇÃO

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Toxicology in vitro* apresentadas em anexo.

Comparação da sensibilidade de técnicas que avaliam dano celular induzido por diferentes tipos de insultos em células astrogliais

Jéssica Taday, Marina Seady, Fabiana Galland, Carlos Alberto Gonçalves, Marina Concli Leite

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

e-mail:

Jéssica Taday – jessicataday@hotmail.com

Marina Seady – mapseady@hotmail.com

FabianaGalland – fabianagalland@yahoo.com.br

Carlos-Alberto Gonçalves – casg@ufrgs.br

Marina Concli Leite - marina.leite@ufrgs.br

Autor Correspondente: Marina Concli Leite

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brasil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5565

E-mail: marina.leite@ufrgs.br

## RESUMO

Astrócitos são células muito estudadas pela sua grande quantidade de funções, porém estes estudos podem sofrer interferências quando há dano celular. Existem muitos métodos de avaliação do dano celular, que podem avaliar a integridade da membrana plasmática, como iodeto de propídeo, azul de tripan, e atividade de LDH extracelular, ou avaliar a viabilidade celular, por redução de MTT e incorporação de vermelho neutro. Uma vez que cada técnica avalia um parâmetro de função celular distinto, elas podem não ter a mesma sensibilidade frente a danos ocasionados por oxidação, glicação ou depleção energética. Por este motivo este trabalho tem como objetivo comparar os ensaios de avaliação de dano celular, em células C6, frente a exposição a diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metilglioxal (MG) ou fluorocitrato (FC). As técnicas analisadas tiveram sensibilidade quando o dano foi induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou por MG. Já para a indução de morte com FC foi observada grande diferença de sensibilidade entre as técnicas. A técnica de LDH surpreendentemente foi a mais sensível após exposição a MG e FC. Deste modo, este trabalho reforça a importância em se utilizar mais de uma técnica para se ter resultados mais confiáveis na avaliação de dano celular em modelos *in vitro*.

Palavras Chave: morte celular; integridade celular, viabilidade celular, linhagem C6.

## INTRODUÇÃO

Astrócitos são células que compõem o sistema nervoso central (SNC), atuando não somente no suporte a neurônios, mas também na formação das sinapses, no metabolismo de neurotransmissores, formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), entre outras funções (Wang and Bordey, 2008). Foi demonstrado que, em passagens altas, as células de linhagem de glioma C6 tem comportamento semelhante a astrócitos (de Souza et al., 2009; Parker et al., 1980), por isto estas células tem sido utilizadas como modelo de astrócitos para a investigação de diversos parâmetros gliais (Hansen et al., 2012). Entretanto, estudos utilizando modelos *in vitro* podem ter seus resultados alterados em virtude de dano celular, como na avaliação da secreção de proteínas, uma vez que a célula que não está mais viável pode ter sua membrana rompida, liberando compostos de forma inespecífica, o que poderia ser confundido com um processo de secreção ativa (Leite et al., 2009; Lunardi et al., 2013).

O dano celular é caracterizado pela presença de disfunções bioquímicas e/ou morfológicas, que podem levar a perda de funções vitais ou até morte celular. Dessa forma, esses parâmetros são utilizados para definir a presença de dano celular (Kroemer et al., 2009). Os ensaios utilizados para verificar dano celular estudam principalmente parâmetros como a integridade da membrana plasmática, o conteúdo de proteínas intracelulares no meio extracelular e a avaliação do metabolismo celular (Kepp et al., 2011; Méry et al., 2017). Entretanto, alguns destes mecanismos também podem estar envolvidos em outros processos não relacionados exclusivamente à morte celular (Kroemer et al., 2009), o que pode gerar confusão na interpretação dos resultados obtidos por esses ensaios.

A integridade da membrana plasmática está intimamente relacionada com a morte celular, pois é perdida quando ocorre o rompimento desta estrutura, permitindo o extravasamento de substâncias do ambiente intracelular, bem como a entrada de substâncias presentes no meio extracelular. Corantes vitais como iodeto de propídeo, azul de tripan e bisbenzimidazóis são utilizados para avaliar a integridade da membrana celular, além da medida da atividade extracelular da enzima LDH (Kepp et al., 2011; Méry et al., 2017).

O iodeto de propídeo é um corante fluorescente com alta afinidade pelo DNA, mas que é incapaz de permear a membrana celular, desta forma é utilizado na avaliação da integridade celular, através da medida da marcação nuclear dentro de uma população celular (Braná et al., 2002). A medida pode ser realizada por observação por microscopia de fluorescência ou medida por fluorimetria em leitor de placas ou ainda, por citometria de fluxo (Riccardi and Nicoletti, 2006). O corante azul de tripan também é impermeável a membrana plasmática, assim cora o núcleo celular quando há comprometimento da integridade celular (Tennant, 1964). A bisbenzimidazolona (Hoechst 33258) é um corante de ligação ao DNA com capacidade de atravessar a membrana plasmática, permitindo a avaliação de alterações da morfologia nuclear que podem indicar morte por apoptose (Bazhulina et al., 2009), isso porque possibilita a visualização do estado de condensação da cromatina, bem como de fragmentação nuclear.

A perda da integridade celular também pode ser avaliada pela medida da atividade extracelular da enzima lactato desidrogenase (LDH) que, em condições normais, é encontrada apenas no ambiente intracelular (Kepp et al., 2011).

A viabilidade celular pode ser estudada utilizando métodos de avaliação do metabolismo celular, como os ensaios de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e incorporação do vermelho neutro (VN) (Kepp et al., 2011; Méry et al., 2017). O MTT é um método que avalia a capacidade redox das células. Neste ensaio, o sal de tetrazólio, MTT, é endocitado e reduzido (Mosmann, 1983) nos compartimentos intracelulares (Liu et al., 1997), formando cristais de formazan de coloração roxa, podendo ser quantificado por colorimetria. Já a capacidade endocítica celular pode ser avaliada utilizando o corante VN, que se acumula em lisossomos, após ser endocitado pelas células (Borenfreund and Borrero, 1984).

O dano celular pode ser causado por distintos mecanismos, como por reações de oxidação, glicação ou ainda por depleção energética, entre outros. As reações de oxidação podem ser desencadeadas pela presença de moléculas de oxigênio no ambiente intracelular, que levam a formação de seu radical reativo (Hancock et al., 2001). O peróxido de hidrogênio produz o radical hidroxila através da reação de Fenton catalisada por íons de ferro (Dringen et al., 2005). Quando não há equilíbrio entre os mecanismos antioxidantes e a formação de espécies reativas de oxigênio, é desencadeado o processo de estresse oxidativo, condição associada a dano celular



causado por peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, acarretando em alterações protéicas estruturais e funcionais, além de danos ao DNA (Kim et al., 2015).

A glicação ocorre através da reação entre glicose, quando em altas concentrações, e macromoléculas, o que desencadeia efeitos deletérios às células. Essas reações envolvem a formação de bases de Schiff que são convertidas em produtos de Amadori, formando ao final compostos dicarbonil como o metilglioxal. O metilglioxal quando presente nas células propaga as reações de glicação e ao se ligar a grupamentos amino livres forma os produtos de glicação avançada (AGEs) (Lapolla et al., 2005). A presença deste composto no interior das células é controlada pelas enzimas do sistema glioxalase, porém, sabe-se que altas concentrações de metilglioxal prejudicam a atividade deste sistema, diminuindo seu metabolismo e aumentando a formação de AGEs, prejudicando desta forma o funcionamento celular (Hansen et al., 2012).

A depleção energética é uma condição causada pela falta de ATP no ambiente intracelular, o que causa prejuízos às células por limitar as reações fundamentais para a manutenção de seu funcionamento. O fluorocitrato é um composto extremamente tóxico, devido a sua alta capacidade de inibir a enzima do ciclo do ácido cítrico aconitase, tendo como consequência a diminuição da produção de ATP (Goncharov et al., 2006). Diversos estudos vêm utilizando este composto a fim de inibir o metabolismo de células gliais, uma vez que esse composto parece ser captado de forma específica por essas células (Swanson and Graham, 1994; Tian et al., 2017).

Quando se avalia dano celular é preciso escolher quais técnicas vão fornecer os resultados mais confiáveis frente às diferentes condições impostas às células, tendo em vista que a sensibilidade de cada uma delas a diferentes tipos de dano pode não ser a mesma. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi comparar os ensaios de avaliação de dano celular frente a danos oxidativos, glicantes ou energéticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Materiais:**

Peróxido de hidrogênio 35%, Metilglioxal (MG), Fluorocitrato(FC), iodeto de propídeo (IP), MTT, VN, azul de tripan e materiais de cultura celular foram obtidos da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM), solução

salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) foram adquiridos da Gibco BRL (Carlsbad, CA, EUA) e soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultiab (Campinas, SP, Brasil). Outros reagentes foram comprados de fornecedores locais (Porto Alegre, RS, Brasil).

### **Cultura de células:**

A linhagem de células de glioma C6 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, Maryland, EUA). Células com passagens acima de 100 foram semeadas em garrafas e cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C em ambiente 95% ar/5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem a confluência as células foram semeadas em placas de 96 poços (para quantificação de IP e marcação de Actina) e 24 poços (para microscopia de IP, MTT, VN, LDH e azul de tripan) em densidade de 3000 e 15000 células por poço, respectivamente, ou ainda em lamínulas de 13 mm (para Bisbenzimidazina). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 95% ar/5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Após, em DMEM livre de SFB, o dano celular foi induzido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1000; 500; 250; 100; 50 µM), MG (2; 1; 0,5; 0,25; 0,1 mM) ou FC (1200; 800; 200; 50; 25 µM) e as células foram mantidas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 95% ar/5% CO<sub>2</sub> para posteriores análises de dano celular por diferentes técnicas, como descrito posteriormente. O grupo controle para peróxido de hidrogênio e MG foi realizado com DMEM sem SFB e para o FC com HCl 0,13M em DMEM sem SFB. Essa concentração de HCl não causou alterações em nenhum dos parâmetros avaliados (resultados não mostrados).

### **Iodeto de propídeo:**

Nos últimos quinze minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio, MG ou FC, foi adicionado ao meio de cultura iodeto de propídeo 7,5 µM. Ao final do período de incubação, a fluorescência foi avaliada através de microscópio Nikon invertido com acessório TE-FM de Epi-Fluorescência em 200X e as imagens foram transferidas para um computador com uma câmera digital (para as imagens). A quantificação da fluorescência foi obtida pela razão entre a área de fluorescência (AF) e área de confluência (AC), medidas em Spectramax I3.

### **Redução de MTT:**

Nos últimos trinta minutos de incubação com peróxido de hidrogênio, MG ou FC, foi adicionado ao meio de cultura MTT 50 µg/mL. Ao final, o meio foi removido e os cristais formados pela redução do MTT foram dissolvidos em DMSO. A absorbância foi medida em 650 e 560 nm e a redução de MTT calculada pela fórmula: [(abs 560 nm) - (abs 650nm)].

#### **Incorporação de vermelho neutro:**

Nos últimos trinta minutos de tratamento com peróxido de hidrogênio, MG ou FC, foi adicionado ao meio de cultura VN 50 µg/mL. Ao final, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) duas vezes por cinco minutos e a extração do corante captado foi realizada com 500 µL de uma solução contendo ácido acético/etanol/água (1/50/49, v/v). A absorbância foi medida em 560 nm.

#### **Atividade extracelular de LDH:**

A atividade da LDH foi medida por ensaio cinético comercial da BioClin (Belo Horizonte, Brasil), com algumas adaptações. Ao final das 24 horas de incubação, 50 µL de meio extracelular foram coletados e incubados com 200 µL de reagente de trabalho em placas de 96 poços transparentes a UV. A absorbância foi medida a 340 nm em 4 leituras com intervalos de um minuto. A atividade da LDH foi calculada pela fórmula  $[\Delta\text{Abs}/\text{min} \cdot 8016]$ , conforme descrito nas instruções do kit.

#### **Azul de tripan:**

Uma solução a 1,2% de azul de tripan foi preparada em PBS. Após o período de incubação com peróxido de hidrogênio, MG ou FC, a solução de azul de tripan foi incubada, a uma concentração final de 0,12%, por 2 minutos e as células foram lavadas duas vezes com PBS. A contagem das células foi realizada imediatamente em microscópio Nikon invertido em aumento de 400X em contraste de fase e os resultados foram expressos em percentual de células marcadas em relação ao número total de células.

#### **Bisbenzimidida:**

Uma solução de Bisbenzimidida 100 µM foi preparada em água. Ao final da exposição a peróxido de hidrogênio, MG ou FC, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas com uma

solução de PBS-Triton X-100 0,2 %. A solução de Bisbenzimidazil 100  $\mu$ M foi incubada por 10 minutos. A contagem dos núcleos com morfologia alterada foi realizada em microscópio Nikon invertido com acessório de Epi-Fluorescência em aumento de 400X e os resultados foram expressos em percentual de núcleos alterados em relação ao número total de núcleos contados.

### **Marcação de actina com Rodamina-Faloidina**

Foi preparada uma solução de rodamina-faloidina 2,5 U/mL em PBS. Após 24 horas de incubação com peróxido de hidrogênio, MG ou FC, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente e permeabilizadas com uma solução de PBS-Triton X-100 0,2%. As células foram incubadas por 20 minutos com a solução de rodamina-faloidina e, ao final, a solução foi removida e as imagens obtidas em microscópio Nikon invertido com acessório de Epi-Fluorescência. As imagens foram transferidas para um computador com uma câmera digital.

### **Análise estatística:**

A avaliação estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Duncan sendo considerada uma diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Tratamento com peróxido de hidrogênio:**

No tratamento com peróxido de hidrogênio a concentração de 50  $\mu$ M não evidenciou dano celular para nenhum dos ensaios realizados. A concentração de 100  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio foi a primeira a apresentar dano celular tanto para as técnicas de avaliação de integridade celular, iodeto de propídeo (Figura 1A e 1B) e atividade extracelular de LDH (Figura 1C), quanto pelas técnicas de medida de viabilidade celular, redução de MTT (Figura 2A) e incorporação do VN (Figura 2B). Pela técnica de azul de tripan a perda de integridade da membrana plasmática só foi observada a partir de 250  $\mu$ M (Figura 1D). As alterações morfológicas, avaliadas pela marcação de actina com faloidina, foram observadas a partir de 250  $\mu$ M (Figura 7) e alterações nucleares, avaliadas pela marcação com bisbenzimidazil, a partir de 100  $\mu$ M (Figura 8A e 8B). Em todos os casos o dano celular observado se mostrou progressivo e dependente da concentração de peróxido de hidrogênio testada.

### **Tratamento com metilglioxal:**

No tratamento com MG, a concentração mais baixa testada, 0,1 mM, não apresentou dano celular em nenhuma das técnicas realizadas. O dano celular foi observado a partir de 0,5 mM nas técnicas de iodeto de propídeo (Figura 3A e 3B), azul de tripan (Figura 3D), MTT (Figura 4A) e VN (Figura 4B). Já a técnica de LDH mostrou maior sensibilidade, apresentando dano celular a partir de 0,25 mM (Figura 3C). As alterações morfológicas, avaliadas pela marcação de actina com faloidina, foram observadas a partir de 0,25 mM (Figura 7) e as alterações nucleares, avaliadas pela marcação com bisbenzimidida, a partir de 0,5 mM (Figura 8A e 8C). Em todos os casos o dano celular observado se mostrou progressivo e dependente da concentração de MG testada.

### **Tratamento com fluorocitrato:**

Para exposição ao FC, as técnicas mais sensíveis foram a avaliação da atividade extracelular de LDH (Figura 5C) e a redução do MTT (Figura 6A), onde o dano foi observado a partir de 25  $\mu$ M. A técnica de incorporação de VN apresentou sensibilidade a partir de 50  $\mu$ M (Figura 6B). Já o azul de tripan se mostrou menos sensível que as técnicas anteriores, apresentando dano celular a partir de 200  $\mu$ M (Figura 5D), seguida pelo iodeto de propídeo que teve sensibilidade apenas a partir de 800  $\mu$ M (Figura 5A e 5B). As alterações morfológicas, avaliadas pela marcação de actina com faloidina, foram observadas a partir de 200  $\mu$ M (Figura 7) e as alterações nucleares, avaliadas pela marcação de bisbenzimidida, a partir de 25  $\mu$ M (Figura 8A e 8D). Em todos os casos o dano celular observado se mostrou progressivo e dependente da concentração de FC testada.

## **DISCUSSÃO**

Atualmente a cultura de astrócitos vem sendo muito utilizada no campo científico na elucidação do papel dos astrócitos no SNC (Galland et al., 2017; Gonçalves et al., 2002; Guerra et al., 2011; Nardin et al., 2007). Por este motivo, a compreensão da sua resposta frente a estímulos causadores de dano celular se mostra necessária. Alguns estudos mostram que podem ser encontradas diferenças entre os métodos de avaliação de dano celular em distintos tipos celulares quando este é induzido por diferentes compostos

(Bigl et al., 2007; Bopp and Lettieri, 2008; Fotakis and Timbrell, 2006; Gomez Perez et al., 2017).

Neste trabalho, células de glioma C6 foram tratadas com peróxido de hidrogênio, metilglioxal e fluorocitrato, agentes potencialmente tóxicos, em diferentes concentrações evidenciando um dano celular progressivo, passando de concentrações baixas até concentrações mais altas, a fim de comparar diferentes ensaios de avaliação de dano pela quantificação através de iodeto de propídeo, redução de MTT, incorporação de vermelho neutro, atividade extracelular de LDH, e também pela visualização nuclear através de iodeto de propídeo, azul de tripan e bisbenzimidida.

Sabe-se que o dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio pode levar a morte celular por mecanismos apoptóticos (Clément et al., 1998) ou necróticos, dependendo da concentração usada (Saito et al., 2006; Takeda et al., 1999; Xiang et al., 2016) em diferentes tipos celulares. Neste trabalho, nós observamos que as técnicas de avaliação de integridade celular, iodeto de propídeo e atividade de LDH extracelular, além da viabilidade celular, apresentaram a mesma sensibilidade para este insulto em células astrogliais C6. Desta forma, foi demonstrado que para dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio a avaliação do dano celular pode ser realizada tanto pelas técnicas de avaliação de integridade celular quanto pelas de viabilidade celular. Apenas o azul de tripan se mostrou menos sensível que as demais técnicas. Comparando os dois corantes utilizados podemos atribuir esta diferença às suas estruturas moleculares, uma vez que a do azul de tripan é maior e, portanto, poderia ter uma maior dificuldade em entrar nas células que perderam integridade de sua membrana plasmática, evidenciando apenas um dano maior. Observamos também que a morfologia celular, através da visualização da organização das fibras de actina, não se encontra alterada na concentração em que a maioria das demais técnicas se mostraram sensíveis, mas que estas fibras começam a apresentar desorganização a partir da mesma concentração de peróxido de hidrogênio na qual o azul de tripan evidenciou dano celular. Entretanto, alterações na morfologia nuclear são evidenciadas pela marcação com bisbenzimidida antes de serem observadas alterações na morfologia celular.

Já foi mostrado que o dano celular causado por glicação induzida por exposição a MG leva a morte celular por apoptose em células mesangiais de rato e em pericitos (Kim et al., 2004; Liu et al., 2003). Para este dano foi observado, neste trabalho, que as técnicas de avaliação da viabilidade celular estudadas não apresentaram diferença de

sensibilidade entre si, nem em relação às técnicas de avaliação de integridade de membrana plasmática que utilizam corantes vitais, iodeto de propídeo e azul de tripan. Surpreendentemente, a medida da atividade extracelular de LDH, que avalia integridade celular, mostrou-se mais sensível que as demais técnicas. Com este insulto as alterações morfológicas foram observadas uma concentração mais baixa do que as alterações nucleares.

Apesar de se saber que o FC é um composto altamente tóxico que leva a depleção energética celular (Goncharov et al., 2006), o mecanismo envolvido na morte celular induzida por este composto ainda não está bem esclarecido. Neste trabalho, foi observado que as técnicas de avaliação de dano celular, tanto por avaliação da integridade da membrana plasmática quanto da viabilidade celular, apresentam diferentes sensibilidades no dano celular causado por depleção energética induzida por FC. A avaliação do dano celular por integridade de membrana foi a mais sensível ao analisar este parâmetro pela medida da atividade extracelular de LDH, da mesma forma que a redução de MTT foi mais sensível que a incorporação de VN na avaliação da viabilidade celular. Quanto ao uso de corantes vitais foi observado que surpreendentemente o azul de tripan, mesmo tendo uma estrutura maior que o iodeto de propídeo, foi mais sensível. Na observação das morfologias celular e nuclear, foi mostrado que alterações nucleares podem ser observadas após exposição a concentrações mais baixas do que as necessárias para causar alterações na morfologia celular.

A avaliação de atividade extracelular de LDH se mostrou mais sensível que as demais tanto na exposição a MG quanto a FC, este resultado é surpreendente, visto que esta é uma técnica de avaliação de integridade celular que depende da saída desta enzima do meio intracelular após o rompimento da membrana plasmática, sendo desta forma esperado que técnicas que avaliam o metabolismo celular conseguissem medir o dano celular antes que as técnicas que dependem da perda da integridade da membrana plasmática.

Foi observado quanto aos diferentes mecanismos de indução de dano celular estudados, oxidativos, glicantes e depleção energética que, em condições oxidativas induzidas por peróxido de hidrogênio, só há diferença de sensibilidade ao utilizar o azul de tripan, mas não há diferença entre avaliar dano celular por técnicas de integridade e viabilidade celular. Já ao se utilizar o MG para estudar dano celular frente a condições

glicantes a variabilidade da sensibilidade entre as técnicas é maior ao se utilizar uma técnica de avaliação de integridade de membrana. Por outro lado, não há diferença entre a avaliação com os corantes vitais nem com a viabilidade celular. Diferente das condições anteriores, em uma depleção energética causada por FC são encontradas diferentes sensibilidades para as técnicas de viabilidade celular e também de integridade de membrana.

Em conclusão, nós mostramos que, em culturas de células astrogliais, as técnicas de avaliação de dano celular têm sensibilidade semelhante frente a condições oxidativas e também condições glicantes. Quando a exposição é uma depleção energética as técnicas têm sensibilidades diferentes entre si. Para nossa surpresa a medida de LDH extracelular foi a técnica mais sensível na exposição a MG e a FC. Além disso, podemos concluir que nem sempre a morte celular está associada a uma alteração morfológica. Deste modo, este trabalho reforça a importância de se utilizar mais de uma técnica para se ter resultados mais confiáveis na avaliação de dano celular em modelos *in vitro*, especialmente quando o composto investigado envolver uma depleção energética celular.

Agradecimentos: CNPq, FAPERGS, CAPES



## REFERÊNCIAS

- Bazhulina, N.P., Nikitin, A.M., Rodin, S.A., Surovaya, A.N., Kravatsky, Y.V., Pismensky, V.F., Archipova, V.S., Martin, R., Gursky, G.V., 2009. Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. *J Biomol Struct Dyn* 26, 701-718.
- Bigl, K., Schmitt, A., Meiners, I., Münch, G., Arendt, T., 2007. Comparison of results of the CellTiter Blue, the tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and the lactate dehydrogenase assay applied in brain cells after exposure to advanced glycation endproducts. *Toxicol In Vitro* 21, 962-971.
- Bopp, S.K., Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 8, 8.
- Borenfreund, E., Borrero, O., 1984. In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biol Toxicol* 1, 55-65.
- Brana, C., Benham, C., Sundstrom, L., 2002. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc* 10, 109-114.
- Clément, M.V., Ponton, A., Pervaiz, S., 1998. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett* 440, 13-18.
- de Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., Gonçalves, C.A., 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206, 52-57.
- Dringen, R., Pawlowski, P.G., Hirrlinger, J., 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79, 157-165.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160, 171-177.

Galland, F., Negri, E., Da Ré, C., Fróes, F., Strapazzon, L., Guerra, M.C., Tortorelli, L.S., Gonçalves, C.A., Leite, M.C., 2017. Hyperammonemia compromises glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. *Neurotoxicology* 62, 46-55.

Gomez Perez, M., Fourcade, L., Mateescu, M.A., Paquin, J., 2017. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Anal Biochem* 535, 43-46.

Gonçalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Gonçalves, C.A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 13, 1533-1535.

Goncharov, N.V., Jenkins, R.O., Radilov, A.S., 2006. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. *J Appl Toxicol* 26, 148-161.

Guerra, M.C., Tortorelli, L.S., Galland, F., Da Ré, C., Negri, E., Engelke, D.S., Rodrigues, L., Leite, M.C., Gonçalves, C.A., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* 8, 128.

Hancock, J.T., Desikan, R., Neill, S.J., 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29, 345-350.

Hansen, F., de Souza, D.F., Silveira, S.a.L., Hoefel, A.L., Fontoura, J.B., Tramontina, A.C., Bobermin, L.D., Leite, M.C., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2012. Methylglyoxal alters glucose metabolism and increases AGEs content in C6 glioma cells. *Metab Brain Dis* 27, 531-539.

Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G., 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10, 221-237.

Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 24, 325-340.

Kim, J., Son, J.W., Lee, J.A., Oh, Y.S., Shinn, S.H., 2004. Methylglyoxal induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in bovine retinal pericytes. *J Korean Med Sci* 19, 95-100.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009, N.C.o.C.D., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.

Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D., 2005. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 38, 103-115.

Leite, M.C., Galland, F., de Souza, D.F., Guerra, M.C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 87, 2439-2446.

Liu, B.F., Miyata, S., Hirota, Y., Higo, S., Miyazaki, H., Fukunaga, M., Hamada, Y., Ueyama, S., Muramoto, O., Uriuhara, A., Kasuga, M., 2003. Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney Int* 63, 947-957.

Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-593.

Lunardi, P., Nardin, P., Guerra, M.C., Abib, R., Leite, M.C., Gonçalves, C.A., 2013. Huperzine A, but not tacrine, stimulates S100B secretion in astrocyte cultures. *Life Sci* 92, 701-707.

Méry, B., Guy, J.B., Vallard, A., Espenel, S., Ardail, D., Rodriguez-Lafrasse, C., Rancoule, C., Magné, N., 2017. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death* 10, 1179670717691251.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Battastini, A.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2007. S100B content

and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50, 774-782.

Parker, K.K., Norenberg, M.D., Vernadakis, A., 1980. "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* 208, 179-181.

Riccardi, C., Nicoletti, I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.

Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kimata, J., Kinumi, T., Yoshida, Y., Noguchi, N., Niki, E., 2006. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 40, 619-630.

Swanson, R.A., Graham, S.H., 1994. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. *Brain Res* 664, 94-100.

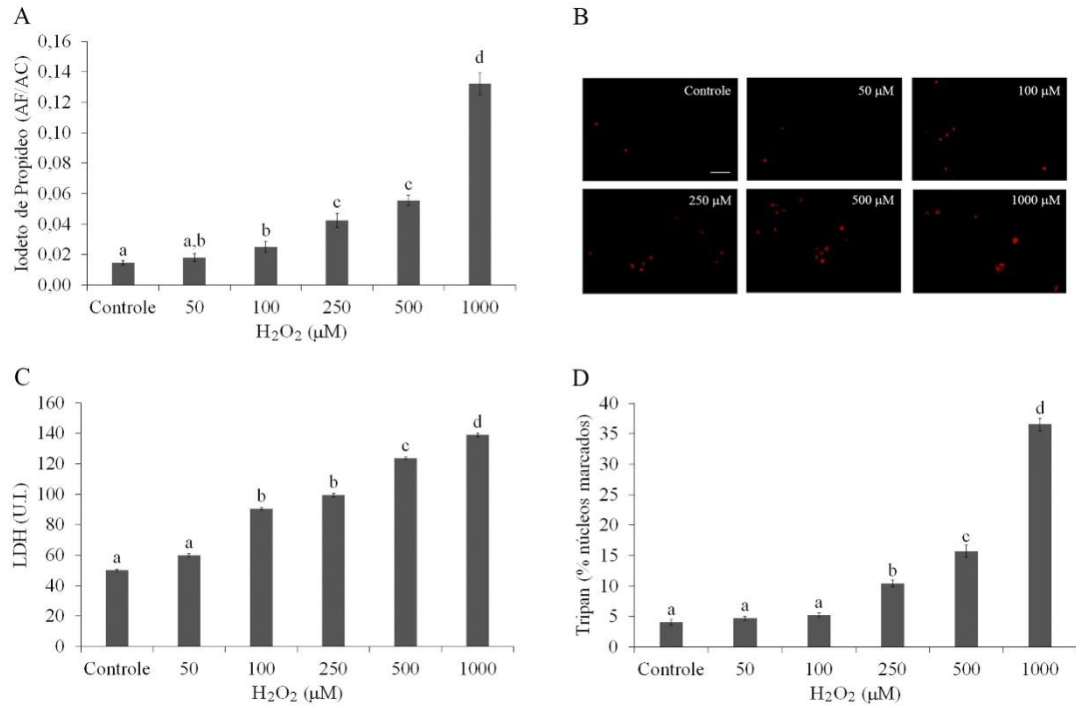
Takeda, M., Shirato, I., Kobayashi, M., Endou, H., 1999. Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron* 81, 234-238.

Tennant, J.R., 1964. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. *Transplantation* 2, 685-694.

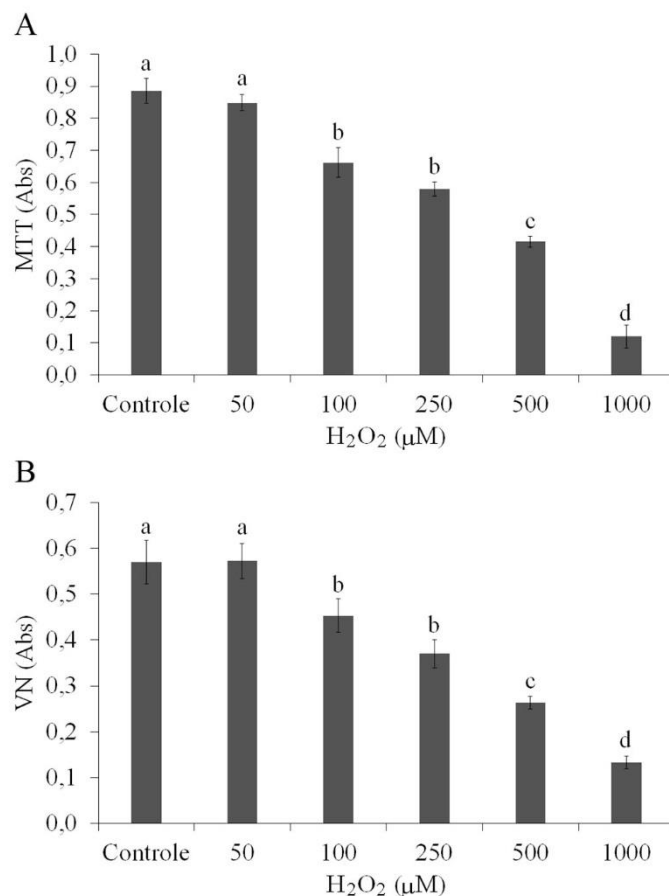
Tian, G., Luo, X., Tang, C., Cheng, X., Chung, S.K., Xia, Z., Cheung, C.W., Guo, Q., 2017. Astrocyte contributes to pain development via MMP2-JNK1/2 signaling in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Life Sci* 170, 64-71.

Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86, 342-367.

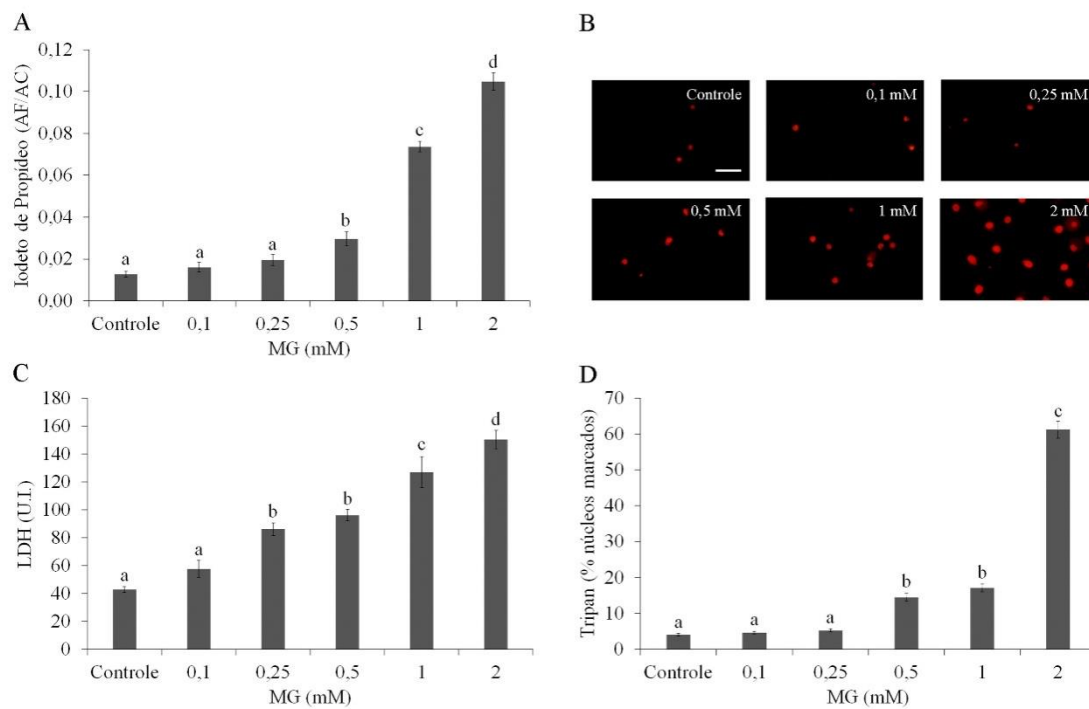
Xiang, J., Wan, C., Guo, R., Guo, D., 2016. Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *Biomed Res Int* 2016, 7343965.



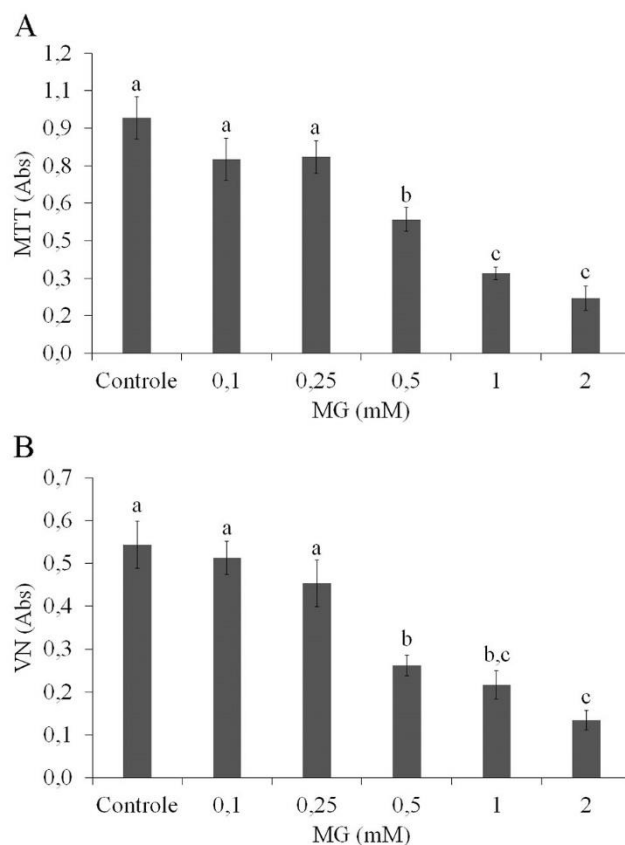
**Figura 1 Avaliação da integridade celular de células C6 expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** As células astrogiais de glioma C6 foram expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50; 100; 250; 500 ou 1000 μM) por 24 horas. A figura mostra a quantificação de núcleos marcados com iodeto de propídeo (A), uma imagem representativa da marcação de núcleos com iodeto de propídeo (B), a atividade extracelular de LDH (C) e a quantificação de núcleos marcados com azul de tripan (D). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo  $p < 0,05$ . Barra de escala = 50 μm.



**Figura 2 Avaliação da viabilidade celular de células C6 expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** As células astrogliais de glioma C6 foram expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50; 100; 250; 500 ou 1000 μM) e após 24 horas foram realizadas as técnicas de redução de MTT (A) e incorporação de VN (B). Os dados estão representados como média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo p<0,05.

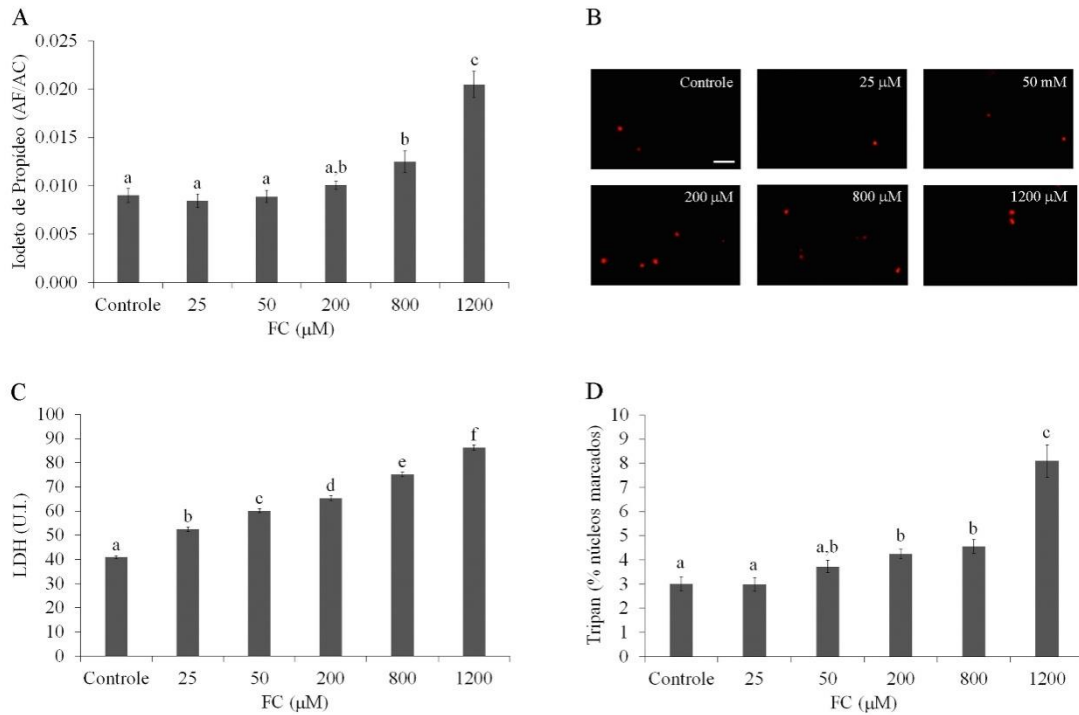


**Figura 3 Avaliação da integridade celular de células C6 expostas a MG:** As células astrogiais de glioma C6 foram expostas a MG (0,1; 0,25; 0,5; 1 ou 2 mM) por 24 horas. A figura mostra a quantificação de núcleos marcados com iodeto de propídeo (A), uma imagem representativa da marcação de núcleos com iodeto de propídeo (B), a atividade extracelular de LDH (C) e a quantificação de núcleos marcados com azul de tripan (D). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo  $p < 0,05$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.

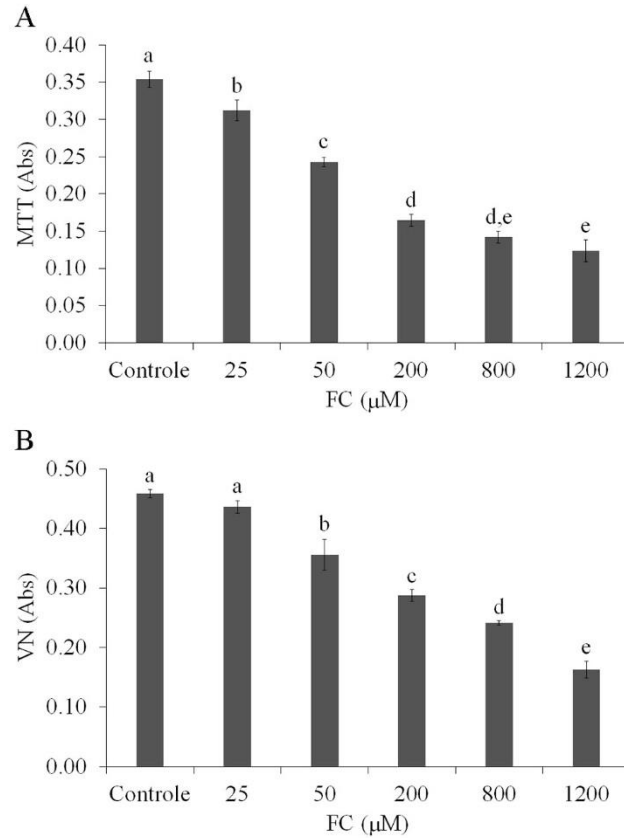


**Figura 4 Avaliação da viabilidade celular de células C6 expostas a MG:** As células astrogliais de glioma C6 foram expostas a MG (0,1; 0,25; 0,5; 1 ou 2 mM) e após 24 horas foram realizadas as técnicas de redução de MTT (A) e incorporação de VN (B). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo  $p < 0,05$ .

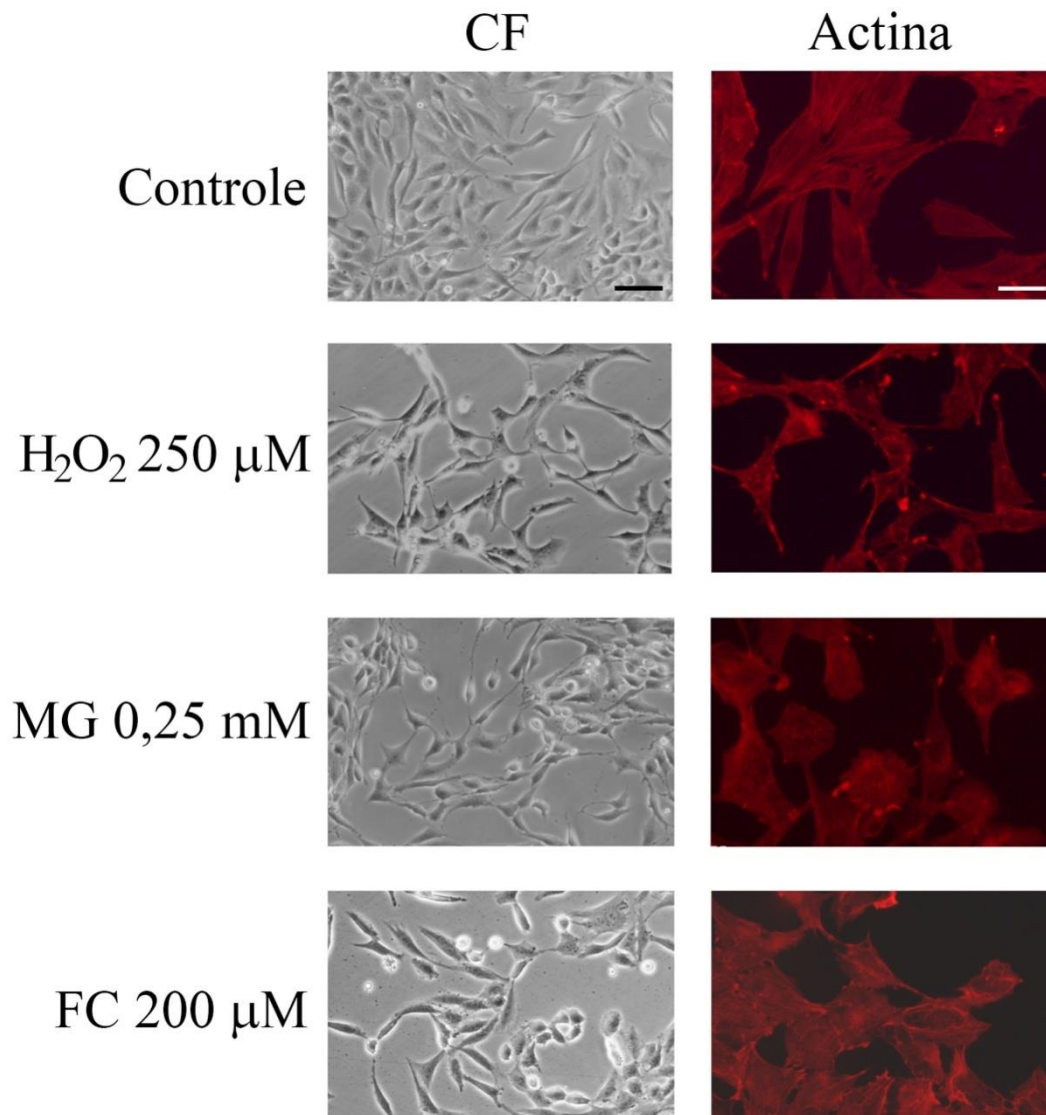




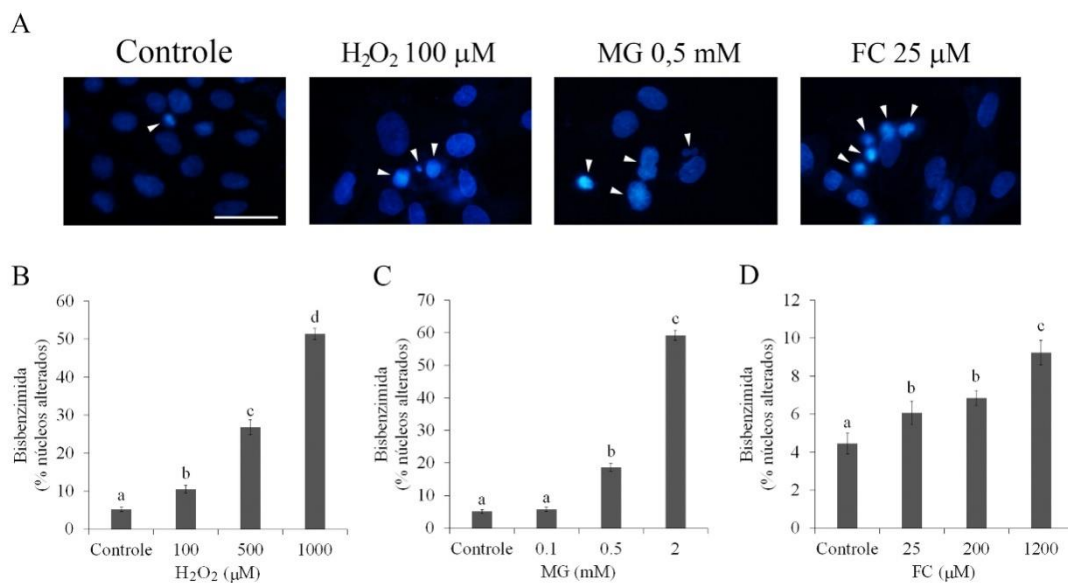
**Figura 5 Avaliação da integridade celular de células C6 expostas a FC:** As células astrogliais de glioma C6 foram expostas a FC (25; 50; 200; 800 ou 1200 μM) por 24 horas. A figura mostra a quantificação de núcleos marcados com iodeto de propídeo (A), uma imagem representativa da marcação de núcleos com iodeto de propídeo (B), a atividade extracelular de LDH (C) e a quantificação de núcleos marcados com azul de tripan (D). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão de no mínimo quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo  $p < 0,05$ . Barra de escala = 50 μm.



**Figura 6 Avaliação da viabilidade celular de células C6 expostas a FC:** As células astrogliais de glioma C6 foram expostas a FC (25; 50; 200; 800 ou 1200) e após 24 horas foram realizadas as técnicas de redução de MTT (A) e incorporação de VN (B). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo  $p < 0,05$ .



**Figura 7 Avaliação da morfologia celular de células C6 expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MG ou FC:** As células astrogiais de glioma C6 foram expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 μM, MG 0,25 mM ou FC 200 μM por 24 h. A figura mostra imagens representativas da morfologia celular, avaliada por contraste de fase (CF) ou pela marcação de actina. Barra de escala = 50 μm.



**Figura 8 Avaliação das alterações nucleares de células C6 expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MG ou FC:** As células astrogliais de glioma C6 foram expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100; 500 ou 1000 µM), MG (0,1; 0,5; ou 2 mM) ou FC (25; 200 ou 1200) e após 24 horas foi realizada a marcação nuclear com bisbenzimidida. A figura mostra imagens representativas dos núcleos alterados (A) e a quantificação do percentual de núcleos alterados para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), MG (C) e FC (D). Forma quantificados no mínimo 6 campos para cada insulto. Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via seguido pelo pós-teste de Duncan, assumindo p<0,05. Barra de escala = 25 µm.



# TOXICOLOGY IN VITRO

Official Journal of the European Society of Toxicology in Vitro

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0887-2333

### DESCRIPTION

*Toxicology in Vitro* publishes original research papers and reviews on the application and use of **in vitro** systems for assessing or predicting the **toxic effects** of chemicals and elucidating their mechanisms of action. These **in vitro techniques** include utilizing cell or tissue cultures, isolated cells, tissue slices, subcellular fractions, transgenic cell cultures, and cells from transgenic organisms, as well as **in silico** modelling. The Journal will focus on investigations that involve the development and validation of new *in vitro* methods, e.g. for prediction of toxic effects based on traditional and *in silico* modelling; on the use of methods in high-throughput **toxicology** and **pharmacology**; elucidation of mechanisms of toxic action; the application of **genomics**, **transcriptomics** and **proteomics** in toxicology, as well as on comparative studies that characterise the relationship between *in vitro* and **in vivo** findings. The Journal strongly encourages the [submission](#) of manuscripts that focus on the development of *in vitro* methods, their practical applications and regulatory use (e.g. in the areas of food components cosmetics, pharmaceuticals, pesticides, and industrial chemicals). *Toxicology in Vitro* discourages papers that record reporting on toxicological effects from materials, such as plant extracts or herbal medicines, that have not been chemically characterized.

NEW! Special rate for [ESTIV](#) members now available. For more information contact Dr. Erwin van Vliet  
Regentenland 35

3994 TZ, HoutenThe Netherlands

E-mail: [treasurer@estiv.org](mailto:treasurer@estiv.org)

or visit the ESTIV website at <http://www.estiv.org/>

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

### AUDIENCE

Academic, governmental and industrial laboratories using in vitro techniques.

## IMPACT FACTOR

---

2016: 2.866 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
Elsevier BIOBASE  
Chemical Abstracts  
Current Contents/BIOMED Database  
Current Contents/Life Sciences  
Current Contents/SciSearch Database  
Current Contents/Science Citation Index  
EMBASE  
Research Alert  
Toxicology Abstracts  
Scopus  
EMBiology

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors*

**Daniel Acosta**, Dean Emeritus, Winkle College of Pharmacy, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45267, USA  
**Frank A. Barile**, Professor of Clinical & Applied Toxicology, Department of Pharmaceutical Sciences, St. John's University College of Pharmacy, 8000 Utopia Parkway, Queens, NY 11439, USA  
**Bas J. Blaauboer**, Inst. for Risk Assessment Sciences (IRAS), Utrecht University, P.O. Box 80177, 3508 TD, Utrecht, Netherlands

### *Associate Editors*

**Kerstin Stemmer**, Institute for Diabetes and Obesity (IDO), Division of Metabolism and Cancer, Helmholtz Centre Munich, Business Campus Garching, Parkring 13, 85748 Garching, Germany  
**Paul Jennings**, Dept. of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, VU University, De Boelelaan 1083, 1081 HV, Amsterdam, Netherlands  
**Mathieu Vinken**, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Brussels, Belgium  
**Julio Davila**, Dept. of Biochemistry, University of Puerto Rico School of Medicine, Medical Sciences Campus, San Juan, Puerto Rico  
**Matteo Goldoni**, Dept. of Clinical and Experimental Medicine, Università degli Studi di Parma, Via Gramsci 14, 43126, Parma, Italy

### *International Editorial Board*

**A. Baeza-Squiban**, Université Paris Diderot (Paris 7), Paris, France  
**G. Bánfalvi**, University of Debrecen, Debrecen, Hungary  
**M.D. Barratt**, Marlin Consultancy, Bedford, England, UK  
**R.L. Bronaugh**, Food and Drug Administration (FDA), College Park, Maryland, USA  
**R.D. Combes**, Norfolk, UK  
**G. Dal Negro**, GlaxoSmithKline, Verona, Italy  
**G.L. DeGeorge**, MB Research Labs, Spinnerstown, Pennsylvania, USA  
**M. Ehrich**, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Virginia, USA  
**M.B. Genter**, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA  
**M.H. Grant**, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, UK  
**R.L. Grant**, Texas Commission on Environmental Quality, Austin, Texas, USA  
**S.G. Grant**, University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), Pittsburgh, Pennsylvania, USA  
**A. Gray**, Thor Personal Care SAS, Compiègne Cedex, France  
**G. Groothuis**, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, Netherlands  
**G.J.M.J. Horbach**, N.V. Organon, Oss, Netherlands  
**I. Kimber**, University of Manchester, Manchester, England, UK  
**A. Mally**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany  
**J.E. Manautou**, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA  
**M. Marinovich**, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy  
**R. Melchert**, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA  
**N.A. Monteiro-Riviere**, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA  
**D. Morgan**, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, North Carolina, USA

**M. Murias**, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland  
**M. Nagao**, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan  
**A. Natsch**, Givaudan Schweiz AG, Dübendorf, Switzerland  
**A.K. Nüssler**, Technische Universität München, München, Germany  
**L. G. Ocañas**, Universidad Autónoma de Nuevo León, Garza Garcia, Nuevo León, Mexico  
**J.E. O'Connor**, Universitat de València, Valencia, Spain  
**A. Puga**, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA  
**I.M.C.M. Rietjens**, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands  
**R. Rodriguez Proteau**, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA  
**H. Seibert**, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Germany  
**A.C. Skladanowski**, Medical University of Gdańsk, Gdansk, Poland  
**M.A. Sogorb**, Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), Elche, Spain  
**E. Testai**, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy  
**C. Urani**, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano, Italy  
**J. van Benthem**, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, Netherlands  
**B. van der Burg**, BioDetection Systems BV (BDS), Amsterdam, Netherlands  
**R.H.S. Westerink**, Utrecht University, Utrecht, Netherlands  
**X. Yu**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

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

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

## INTRODUCTION

### *Types of paper*

The Journal's main purpose will be the publication of papers reporting and interpreting original toxicological research involving the application or development of in vitro techniques. Brief Communications (2,500 word limit) documenting important new findings warranting expeditious publication will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the Journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. *Toxicology in Vitro* also welcomes Correspondence from the scientific community, especially as they relate to Hot Topics and Debates. These are handled directly by the Editor-in-Chief and may be accompanied by responses.

### *Submission checklist*

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

#### **Ensure that the following items are present:**

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

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

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

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

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

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

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

### *Conflict of Interest*

*Toxicology in Vitro* follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that



could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

### **Submission declaration and verification**

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

### **Changes to authorship**

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

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

#### *Article transfer service*

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

### **Copyright**

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

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

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

## **Author rights**

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

### *Elsevier supports responsible sharing*

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

## **Role of the Funding Source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### *Funding body agreements and policies*

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

## **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

### **Subscription**

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

### **Open access**

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

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

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

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

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

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

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

The open access publication fee for this journal is **USD 2750**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### *Green open access*

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

This journal has an embargo period of 12 months.

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

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

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

<http://ees.elsevier.com/tiv>

### **Revised versions**

The medium of submission for revised papers is electronic, through the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/tiv>). Figures should be submitted as original high quality files of a standard graphics program. Revised versions should be returned within 3 months of the first date of decision. Failure to do so will result in any resubmission being treated as a new version and will therefore carry a new date of receipt.

### **Referees**

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

### **Experimental Procedures**

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

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

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

### *References*

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

### *Formatting requirements*

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

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

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

#### *Figures and tables embedded in text*

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

#### **Peer review**

This journal operates a 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.](#)

#### **REVISED SUBMISSIONS**

##### *Use of word processing software*

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

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

#### **Manuscript Format**

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible submissions will be returned to authors for revision. All pages must be numbered, including the Title Page, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, and the names and address of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated). Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Please do not add line numbering to your source file as this will be added automatically by the EES system upon building of the PDF.

#### **Introduction**

Introduction: A concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

#### **Material and methods**

Materials and Methods: A detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well-established methods and techniques may be identified by reference only.

#### **Results**

Results: Presented concisely with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

#### **Discussion**

Discussion: A succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comments are discouraged.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

Abstract: A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

#### *Graphical abstract*

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

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

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

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

### **Abbreviations**

Abbreviations should be used sparingly. 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**

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

### **Nomenclature**

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

#### *Footnotes*

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

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

#### *Formats*

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

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

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

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

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

#### **Please do not:**

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

#### *Color artwork*

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

#### *Figure captions*

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

#### **Tables**

Tables should be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### *Reference links*

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

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

### Data references

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

### Reference management software

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

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicology-in-vitro>

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 pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### Reference style

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

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

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

### Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

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

## 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.

## Supplementary material

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

## RESEARCH DATA

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

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

### *Data linking*

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

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

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

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

### *Mendeley Data*

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



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

#### *Data in Brief*

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

#### *MethodsX*

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

#### *Data statement*

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

#### **AudioSlides**

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

#### **Interactive plots**

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

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Online proof correction**

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

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

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

## **Offprints**

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

## **AUTHOR INQUIRIES**

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

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

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>