

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**COMPARAÇÃO ENTRE A MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-
GLICOSIDASE ÁCIDA EM AMOSTRAS DE FIBROBLASTOS, LEUCÓCITOS E
SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

Jamila Mezzalira

Porto Alegre, junho de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**COMPARAÇÃO ENTRE A MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-
GLICOSIDASE ÁCIDA EM AMOSTRAS DE FLIBROBLASTOS, LEUCÓCITOS E
SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO**

Jamila Mezzalira

Trabalho de Conclusão
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dra. Janice Carneiro Coelho
Orientador

Dra. Cristina Dickie de Castilhos
Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2011.

Agradecimentos

Aos meus pais, Clóvis e Clari, pela confiança e apoio que sempre depositaram em mim, por acreditarem no meu potencial e oportunizar meu crescimento pessoal e profissional.

À minha irmã e grande amiga, Alessandra, pelo carinho, companheirismo, confiança e paciência.

À minha orientadora, Janice Carneiro Coelho, pela amizade, disponibilidade, dedicação, apoio, paciência e ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Cristina Dickie de Castilhos, pela amizade e carinho, disposição, dedicação, sugestões, apoio e incentivo demonstrados sempre com boa vontade.

Aos membros da banca, Alexandre Silva de Mello e Maria Viviane Gomes Müller, por aceitarem o convite.

Às mestrandas, Mariana Goldim e Carla Andrade, pela amizade e grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório 25, Ana Carolina, Cristina, Daniela, Fernando, Jaqueline, Maria Inês, Nicole e Vanessa pela amizade, ajuda e momentos de descontração.

Às grandes amigas que fiz durante a graduação, Aline, Débora, Franciane, Giovana, Paula e Valeska, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos estudos, por tornarem meus dias mais alegres e divertidos.

À Faculdade de Farmácia, ao Departamento de Bioquímica e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

COMPARAÇÃO ENTRE A MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA ALFA-
GLICOSIDASE ÁCIDA EM AMOSTRAS DE FIBROBLASTOS, LEUCÓCITOS E
SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO

Jamila Mezzallira¹, Cristina Dickie de Castilhos^{1,2} e Janice Carneiro Coelho^{1,2}

¹*Departamento de Bioquímica and* ²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:*

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

do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil

* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Profª Dra. Janice Carneiro Coelho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: +55 51 33085546

Fax number: +55 51 33085535

E-mail address: janice.coelho@ufrgs.br

Este artigo foi elaborado segundo as normas do journal “Clinical Biochemistry”
apresentadas em anexo.

Resumo

Objetivos: comparar a atividade da enzima alfa-glicosidase ácida de indivíduos normais e pacientes com Doença de Pompe (DP) em amostras de fibroblastos, leucócitos e sangue impregnado em papel filtro.

Metodologia: o sangue foi coletado, impregnado em papel filtro e processado para separação dos leucócitos. Os fibroblastos foram cultivados e coletados. A análise enzimática foi determinada por ensaios fluorimétricos em amostras de controles saudáveis e pacientes com DP nas diferentes amostras.

Resultado: Quando a atividade enzimática dos controles foi comparada com a dos pacientes, nas amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF) e fibroblastos, observou-se uma diferença significativa entre os dois grupos. Comparando-se a atividade de controles, SPF/fibroblastos observou-se 58,4% de concordância entre os resultados e, SPF/leucócitos 82%. Em leucócitos/fibroblastos controles e fibroblastos/leucócitos/SPF de pacientes obtivemos 100% de concordância entre os resultados.

Conclusão: O papel filtro é um ótimo material para testes de triagem, mas os leucócitos talvez sejam uma alternativa para o diagnóstico bioquímico final.

Palavras-chave: Doença de Pompe, alfa-glicosidase ácida, papel filtro, leucócitos, fibroblastos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD – Ácido Cítrico-dextrose

DLDs – Doenças Lisossômicas de Depósito

DP – Doença de Pompe

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

GAA – Alfa Glicosidase Ácida

MGA – Maltase Glico Amilase

MUG – Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside

SBF – Soro Bovino Fetal

SPF – Sangue em Papel Filtro

TRE – Terapia de Reposição Enzimática

INTRODUÇÃO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) compreendem doenças metabólicas hereditárias, as quais são resultantes da deficiência ou falta da atividade de uma ou mais enzimas específicas ou do defeito de uma proteína de transporte. Essas alterações nas rotas metabólicas resultam em um bloqueio das mesmas, ocorrendo um acúmulo de substratos ou desvios para uma rota alternativa [1,2].

A maioria dos EIM são de herança autossômica recessiva e envolvem processos de síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas no organismo; outros, são ligados ao cromossomo X ou de herança mitocondrial [1,2,3]. Há mais de 500 EIM relatados, dentre os quais encontram-se as Doenças Lisossômicas de Depósito (DLDs) [4].

As DLDs são um grupo de mais de 40 doenças genéticas caracterizadas pela deficiência de enzimas denominadas hidrolases lisossômicas. Essas enzimas são responsáveis pela degradação de macromoléculas no interior dos lisossomos das células e, estando deficientes geram um acúmulo de substrato nessas organelas causando uma série de sintomas que são específicos para cada doença [4, 6, 7].

As manifestações clínicas, nestas doenças, podem variar de leve a grave e os sintomas podem aparecer de forma precoce e progredir de forma rápida [6]. Os sinais e sintomas de cada DLD devem-se ao tipo de substrato acumulado nos lisossomos, ao órgão afetado e à resposta do organismo [7]. Dentre os sintomas, tem-se um amplo espectro de anormalidades esqueléticas, comprometimento do sistema nervoso, disfunções orgânicas e acúmulo de lipídios complexos nos tecidos [4]. Também outros fatores podem impedir ou diminuir a atividade dessas enzimas, como deficiências de proteínas ativadoras, proteínas de transporte ou outra enzima necessária para o correto processamento do substrato acumulado [8].

Individualmente, as DLDs são consideradas raras. No entanto, quando vistas de uma forma geral, elas acometem um em cada 5.000 a 8.000 recém-nascidos [9,10].

A medida da atividade enzimática é a forma de diagnóstico para as DLDs [11] e embora não sejam curáveis, pode ser feito tratamento médico convencional para o alívio dos sintomas, além de tratamentos específicos para cada DLD, como transplante de medula óssea, inibidores da síntese de substrato, terapia com chaperonas, terapia gênica e terapia de reposição enzimática (TRE) [8].

A Doença de Pompe (DP), também conhecida como doença de armazenamento de glicogênio tipo II, é uma DLD de herança autossômica recessiva, rara e progressiva. Nesta DLD, a enzima alfa-D-glicosidase ácida (GAA, EC 3.2.1.3), que cliva as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 encontra-se deficiente, gerando um acúmulo de glicogênio nos lisossomos das células, principalmente do tecido muscular, e com isso, o aparecimento das lesões e sintomas clínicos [5,12,13,14]. Possui uma incidência estimada de 1:40.000 nascimentos, sendo associada com diversos fenótipos clínicos com envolvimento de órgãos diversos, idade de início e gravidade. São conhecidas mais de 200 mutações patogênicas no gene da GAA que possuem correlação com os fenótipos da doença [13,15].

O início da doença é muito variável, podendo ser na infância, na fase juvenil ou em adultos. No entanto, o tipo infantil é considerado mais grave por apresentar cardiomiopatia hipertrófica e hipotonia, podendo levar a óbito por insuficiência cardiorrespiratória normalmente em torno de 1 ano de idade. As outras, de início tardio, são formas mais brandas caracterizadas principalmente por fraqueza muscular e não possuir envolvimento cardíaco. Porém, a insuficiência respiratória pode causar a morte de pacientes que apresentam estas formas da doença [5,13,15,16].

O diagnóstico para DP, atualmente, é realizado através da medida da atividade da GAA usando o substrato sintético fluorimétrico 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside (4-MUG) em biópsias musculares, fibroblastos cultivados a partir de biópsias de pele, leucócitos totais ou linfócitos purificados de sangue [12].

O diagnóstico precoce da DP, assim como das demais DLDs, é uma etapa essencial para que os tratamentos em desenvolvimento sejam mais eficazes, visto que a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) para DP já está disponível (Myozyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, EUA) [15,17]. Para isso, tem-se desenvolvido métodos de triagem onde a medida da atividade das enzimas lisossomais é realizada de forma direta em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SPF) [16,17,18].

O uso SPF é somente utilizado como método de triagem e não como diagnóstico final pois seus resultados são baseados na medida da atividade enzimática total e não na medida da atividade enzimática específica como é realizado para leucócitos e fibroblastos. Além disso, o ensaio enzimático para DP em SPF sofre interferência de outra alfa-glicosidase, a maltase-glicoamilase (MGA ou alfa-glicosidase neutra) presente em

neutrófilos, podendo haver uma atividade residual no ensaio ocasionando um resultado falso-negativo [12].

A medida da atividade da GAA em SPF foi descrita [16,19] utilizando-se a acarbose como inibidor específico da MGA, eliminando sua interferência no resultado, por estar presente em baixas concentrações no ensaio.

O uso de leucócitos totais também é utilizado para o diagnóstico de deficiência enzimática devido a rapidez do método e da obtenção das amostras de sangue. No entanto, há riscos de resultados falso-negativos devido à presença da alfa-glicosidase neutra exercer um atividade residual mesmo na presença da acarbose [12].

Fibroblastos não contém a enzima MGA [16] e, por isso, podem ser usados como diagnóstico confirmatório para DP, sendo considerados “padrão ouro” para a determinação da atividade residual da GAA [5,12].

Entretanto, o uso de SPF possui vantagens quando comparado aos outros materiais biológicos, como: facilidade para transporte, pois pode ser enviado via correio em envelope convencional sem necessidade de ser refrigerado [20]; fácil armazenamento das amostras [21], com atividade da enzima alfa-glicosidase ácida preservada por até 10 dias em diferentes temperaturas [22], menor volume de reação, diminuindo os custos em relação aos ensaios convencionais [18] e maior segurança na manipulação das amostras, diminuindo as chances de contaminação [20].

Sabendo-se da necessidade de diagnóstico precoce da DP a fim de tornar o tratamento mais eficaz e melhorar a qualidade de vida do paciente [13, 15], neste trabalho nós comparamos a atividade da alfa-glicosidase ácida de indivíduos normais e pacientes com doença de Pompe nos três tipos de material: SPF, leucócitos e fibroblastos de modo a observarmos se o SPF é um bom material para a triagem desta doença e se a atividade em leucócitos pode ser utilizada como padrão ouro no diagnóstico da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em conformidade com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial para os princípios éticos envolvendo pesquisa clínica com seres humanos. Os participantes assinaram um termo de consentimento informado.

Amostras

As amostras de sangue utilizadas como controles normais foram coletadas dos doadores do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), obtidas a partir de 10 mL de sangue coletado com anticoagulante heparina. Os tubos de heparina sódica foram Vacutainer, Becton and Dickinson (São Paulo, SP, Brazil, www.bd.com/brasil). No cartão de papel filtro Whatman 903® Schleicher & Schuell (proveniente da Whatman - S&S Grade 903, Schleicher and Schuell, Whatman, Kent, UK, www.whatman.com), foram pingadas (em cada círculo) duas gotas de sangue, uma sobre a outra, e o restante foi utilizado para a separação de leucócitos.

As amostras de SPF e leucócitos de indivíduos com DP foram obtidas após diagnóstico dos mesmos em nosso laboratório e confirmação por análise molecular. Este material, que seria descartado após a análise, foi armazenado para nosso projeto, sem identificação do paciente.

As amostras de fibroblastos de indivíduos normais foram obtidas a partir de pele após cirurgia. Esta amostra seria descartada pelo cirurgião e foi gentilmente cedida para nosso trabalho. Estas amostras foram utilizadas sem identificação alguma dos doadores. As amostras de pacientes portadores da DP foram aquelas previamente diagnosticadas em fibroblastos e armazenadas no banco de amostras do nosso laboratório de pesquisa - Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo – Doenças Lisissômicas de Depósito (LEIM-DLD). Estas, depois de pareadas com o sangue e leucócitos do mesmo paciente, foram utilizadas sem a identificação do mesmo.

Todas as amostras foram devidamente identificadas com números, preservando a identidade dos doadores.

Para a utilização destas amostras, foi assinado Termo de Consentimento de Amostras Descartadas pelo graduando e seu orientador.

O armazenamento do SPF foi feito sob refrigeração à 4°C até ser processado e, após, armazenado a -20°C, enquanto as amostras de fibroblastos e leucócitos foram armazenadas a -20°C/-40°C, mesmo quando ainda não processadas.

Separação de leucócitos

O sangue restante, após a impregnação no papel filtro foi utilizado para a separação dos leucócitos, com base na técnica descrita por Skoog e Beck [23]. Ao volume de sangue foi adicionado igual quantidade de uma mistura contendo ácido cítrico-dextrose (ACD), dextran 6% e glicose 5%, deixando em repouso por 1 hora para sedimentar os eritrócitos. Transcorrido o tempo de sedimentação, o sobrenadante foi retirado e centrifugado (em centrífuga HITACHI High-Speed Refrigerated Centrifuge - Himac CR 22GII) a 2000rpm, por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o precipitado obtido (pellet) foi ressuscitado em água gelada, NaCl 0,9% e NaCl 3,6% e centrifugado a 3000rpm por 4 minutos a 4°C. Ao final do processo, foi obtido um pellet de leucócitos que foi armazenado a -40°C até o momento das análises.

Cultura de fibroblastos

A biópsia de pele, após coleta, foi lançada em frascos de cultura esterilizados (Techno Plastic Products AG, Suíça, www.tpp.ch) para o cultivo das células, baseada na técnica descrita por Coelho e Giugliani [24]. A amostra de pele foi fragmentada, em pequenos pedaços (explantes) de 1mm de diâmetro, aproximadamente, e transferida para frascos de cultura esterilizados (mínimo 15 explantes). Após lançamento foi adicionado meio de cultura HAM F100 (Gibco BRL Invitrogen, Grand Island, NY, www.invitrogen.com), contendo 20% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL Invitrogen Grand Island, NY, www.invitrogen.com) e mantido em estufa (Thermo Electron Corporation – REVCO, www.revco-sci.com/techweb) a 37°C. O meio de cultura foi trocado semanalmente.

Quando, ao redor dos explantes, foi observada uma confluência de células, foi necessário realizar uma tripsinização no frasco de cultura celular (adição de tripsina-EDTA 0,25% para soltar as células) com o intuito de estimular o crescimento celular e de promover também um crescimento mais uniforme, em termos de distribuição. Quando o crescimento dos fibroblastos estava uniforme e o frasco quase que totalmente cheio de fibroblastos (confluência de 80 a 90% aproximadamente) foi realizada uma divisão das células com adição de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco BRL Invitrogen Grand Island, NY, www.invitrogen.com) para posterior coleta e congelamento dos mesmos.

Coleta dos fibroblastos

As células foram lavadas 2 vezes com 2 mL de PBS 0,02% pré-aquecido. Removido o PBS adicionou-se 2 mL de solução de EDTA 0,02% em PBS. Após, foram adicionadas 3 gotas de tripsina-EDTA 0,25%. As células foram incubadas por 10 minutos a 37°C em estufa (Thermo Electron Corporation – REVCO, www.revco-sci.com/techweb) e transferidas com pipeta Pasteur para um tubo de centrífuga em banho de gelo. Os frascos foram lavados com 2 mL de PBS 0,02% duas vezes e centrifugados a 4°C por 10 minutos a 2000 rpm em centrífuga refrigerada (HITACHI High-Speed Refrigerated Centrifuge - Himac CR 22GII). O sobrenadante foi decantado e lavado duas vezes com 5 mL de salina 0,9%. A centrifugação foi repetida, o sobrenadante descartado e as células armazenadas até a dosagem em freezer de -80°C.

Medida da atividade da GAA

A medida da atividade da enzima α -glicosidase ácida foi determinada através de ensaios fluorimétricos nos diferentes tipos de amostras. Em todos os ensaios foi utilizado o substrato produzido artificialmente com radical 4-metilumbeliferil (fluorescente), denominado 4-Metilumbeliferil- α -D-glicopiranosídeo fornecido pela Sigma (St. Louis, MO, USA, www.sigma.com). Nos ensaios para SPF e leucócitos usou-se acarbose (adquirida de Toronto Research Chemicals Inc. - Ontário, Canadá, www.trc-canada.com) como inibidor da α -glicosidase neutra. As incubações foram realizadas em incubadora com agitação (CT712 – Cientec) e as leituras de fluorescência, realizadas em fluorômetro com leitor de placa (SpectraMax Gemini XPS – Molecular Devices—M5).

Os ensaios em SPF foram realizados em duplicata, nos quais foram feitos picotes (picotador Harris Uni-Core 1.2 mm punch - St. Louis, MO, USA, www.sigma.com) de 1,2mm (do papel filtro S&S 903) que foram inseridos nas placas fuorimétricas de 96 poços, seguidos da adição de 8 μ L água, 16 μ L solução de ensaio (120 μ L solução 10mM do substrato, 30 μ L solução 8mM de acarbose e 2,9mL tampão citrato-fosfato 0,2M[pH 4]contendo triton-x100 0,6g/L) e 200 μ L tampão glicina-NaOH (pH 10,3) nos brancos antes da incubação e nas amostras testes ao término da incubação.

Para os ensaios em leucócitos usamos um branco por ensaio e duplicata das amostras. A seqüência do procedimento foi adição de 20 μ L água no branco do ensaio e

20 μ L homogeneizado de leucócitos totais dissolvido em água nos testes, seguidos da adição de 40 μ L solução de ensaio (descrita acima para ensaio em SPF) e 1mL tampão glicina-NaOH (pH 10,3) ao final da incubação para interromper a reação.

No ensaio para determinação da atividade da GAA em fibroblastos, foi utilizado um branco por ensaio e duplicata das amostras. A técnica foi realizada acrescentando 20 μ L de água no branco e 20 μ L de homogeneizado de fibroblastos dissolvidos em água nos testes, seguidos da adição de 20 μ L de solução 2mM do substrato (preparada com tampão acetato 0,2M - pH 4) e 3mL de tampão glicina-NaOH (pH 10,3) ao final da incubação para interromper a reação.

As técnicas utilizadas foram baseadas naquelas propostas por Li e colaboradores [19] para papel filtro e leucócitos, e por Butterworth e Droadhead [25] para fibroblastos. Em SPF houve redução nos volumes da reação conforme Castilhos e colaboradores [22], em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa LEIM-DLD, permitindo realizar a técnica em placa fluorimétrica preta de 96 poços (Techno Plastic Products AG-TPP, Suíça). Após o período de incubação, de 20 horas para SPF, 2 horas para leucócitos e 1 hora para fibroblastos, as leituras (465nm excitação e 450nm emissão) foram realizadas em fluorometro com leitor de placa (SpectraMax Gemini XPS – Molecular Devices).

Para os leucócitos e fibroblastos, antes do ensaio enzimático, foi preparado um homogeneizado da amostra que foi diluída em água e sonicado (Sonicator Ultrasonic Processor XL – Heat Systems). Após, realizou-se a dosagem de proteínas totais, utilizando a técnica colorimétrica de Lowry e colaboradores [26] miniaturizada, realizada em placas transparentes de fundo plano de 96 poços, de modo a expressarmos a atividade por nanomol de substrato hidrolisado por hora por mg de proteínas (nmol/h/mg prot). A atividade enzimática em SPF foi expressa como nanomol de substrato hidrolisado por 20 horas por mililitro (nmol/20h/mL).

Análise estatística

As análises foram desenvolvidas usando o programa GraphPad Prism 5. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e comparados usando o teste t de Student para amostras não pareadas entre grupos de indivíduos saudáveis e pacientes. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No presente trabalho, comparamos a atividade da alfa-glicosidase ácida de indivíduos normais e pacientes com DP em SPF, leucócitos e fibroblastos. A figura 1 apresenta a atividade da GAA em amostras de SPF de controles saudáveis e pacientes com DP. A atividade média da enzima em controles saudáveis foi $10,06 \pm 5,83$ nmol/20h/mL, enquanto para pacientes com DP a atividade média foi $0,09 \pm 0,15$, demonstrando uma diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$), os pacientes apresentando atividade enzimática significativamente menor.

A figura 2 apresenta a atividade da GAA em amostras de fibroblastos de controles saudáveis e pacientes com DP. A atividade média da enzima em controles saudáveis foi $155,40 \pm 92,29$ nmol/h/mg prot, enquanto para pacientes com DP a atividade média foi $1,45 \pm 1,61$ nmol/h/mg prot, demonstrando uma diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$), estando a atividade da GAA significativamente diminuída nos pacientes.

Os resultados individuais da atividade da enzima GAA para os controles e pacientes com DP podem ser observados na tabela 1. Quando comparamos a atividade em SPF e fibroblastos de controles, observamos 58,4% de concordância entre os resultados, sendo que, somente cinco indivíduos normais apresentaram atividade da GAA diminuída no papel filtro e normal nos fibroblastos. Quando comparamos a atividade em leucócitos e fibroblastos de controles e fibroblastos-leucócitos-SPF de pacientes, obtivemos 100% de concordância entre os resultados. Na comparação entre SPF e leucócitos de controles, observamos 82% de concordância entre os resultados, sendo que algumas amostras em papel filtro com atividade diminuída apresentaram atividade normal nos leucócitos.

DISCUSSÃO

A Doença de Pompe é caracterizada pelo acúmulo de glicogênio nos lisosomos celulares gerando o aparecimento de lesões e sintomas clínicos [11,12,13]. O diagnóstico precoce da DP é uma etapa essencial para a eficácia do tratamento e melhora na qualidade de vida do paciente [12,14], tendo em vista que a idade média de diagnóstico ocorre em torno de 5 meses de idade, enquanto o aparecimento dos sintomas ocorre em torno de 2 meses de idade [13].

Embora o padrão-ouro para diagnóstico da DP seja a medida da atividade da GAA em fibroblastos cultivados da pele, amostras de sangue também estão sendo utilizadas, pois esses testes são menos invasivos, mais rápidos e são mais fáceis de padronizar [15].

O uso de SPF vem sendo utilizado por muitos grupos para triagem das DLDs através de diferentes métodos para análise enzimática [15,16,17]. O uso de leucócitos totais também é utilizado para o diagnóstico de deficiência enzimática devido a rapidez do método e da obtenção das amostras de sangue [11]. Em nosso trabalho, nos propomos a observar se o SPF é um bom material de triagem para Doença de Pompe e se a atividade em leucócitos pode ser utilizada como padrão ouro no diagnóstico da doença.

O diagnóstico definitivo da DP é realizado em fibroblastos, pois estes expressam somente a enzima alfa-glicosidase ácida (deficiente na doença) e, não contem isoenzimas da alfa-glicosidase. A maltase-glicoamilase (MGA), isoenzima presente em neutrófilos, está presente em amostras de SPF e em leucócitos, inteferindo nos resultados por exercer uma atividade enzimática residual que se sobrepõe a atividade da GAA, e com isso um possível resultado falso-negativo. Desta forma, o uso da acarbose é essencial no ensaio, pois é um inibidor seletivo da MGA, eliminando sua interferência no resultado.

A medida da atividade da enzima alfa-glicosidase ácida foi realizada em amostras de SPF de controles saudáveis e pacientes e, quando os resultados foram comparados revelou diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$), mostrando que os grupos podem ser claramente diferenciados não havendo sobreposição entre os valores encontrados para as atividades da enzima (Fig 1). Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por outros grupos [13,15,21], onde observaram que os pacientes foram identificados de forma confiável, demonstrando que o uso da acarbose foi essencial para diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes, com maior confiabilidade. Gasparotto et al. [21] e Winchester et al. [15] afirmam que SPF pode ser usado, porém sugerem o uso de outra enzima como controle para melhorar a confiabilidade dos resultados. Segundo Lukacs et al.[13], o uso do SPF ofereceu um diagnóstico confiável para as variantes da doença, relatando que nos Estados Unidos, Europa e Taiwan já utilizam o SPF como método de triagem.

Da mesma forma, quando a medida da atividade da enzima GAA foi realizada em amostras de fibroblastos de controles saudáveis e pacientes, os resultados revelaram

diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$), mostrando que os grupos podem ser claramente diferenciados não havendo sobreposição entre os valores encontrados para as atividades da enzima (Fig 2). Sabendo que em fibroblastos não encontramos α -glicosidases interferentes, os resultados estão em conformidade com dados da literatura visto que o diagnóstico padrão-ouro para DP é realizado em amostras de fibroblastos cultivados [5,12,15].

A comparação entre as atividades médias da GAA em amostras de leucócitos, de controles saudáveis e pacientes, não pode ser realizada devido a indisponibilidade de obtenção das amostras de leucócitos de pacientes com DP. No entanto, Winchester et al.[15] e Van Diggelen et al. [27] estudaram o uso de leucócitos para diagnóstico da DP comparando o uso do substrato sintético (4-MUG) com o natural (glicogênio) e o uso da acarbose. Ambos observaram que a acarbose melhorou os resultados por inibir as glicosidases interferentes e, no ensaio usando glicogênio (substrato natural) foi possível distinguir claramente os controles normais de pacientes, o que não ocorreu quando o substrato artificial (4-MUG) foi usado. Winchester et al. [15] sugerem o uso de outra enzima como referencial para testar a qualidade da amostra e melhorar a confiabilidade dos resultados. Van Diggelen et al. [27] relatam que desde a introdução da acarbose, o diagnóstico padrão-ouro para DP, em seu laboratório, é realizado em leucócitos com glicogênio como substrato.

Quando as diferentes amostras foram comparadas entre si (Tab 1), mostraram elevada concordância entre as atividades enzimáticas, principalmente entre leucócitos e fibroblastos (de controles) e SPF e fibroblastos (de pacientes) onde obtivemos resultados equivalentes para todas as amostras. Para algumas amostras foram obtidos resultados falso-positivos na triagem em SPF, fato aceitável visto que podem ser confirmados. O contrário, obtenção de resultado falso-negativo, não ocorreu em nossos ensaios, o que é um bom indício, pois se obtido não seria confirmado acarretando assim, uma falha no diagnóstico de prováveis pacientes.

Nossos dados permitem concluir que o sangue em papel filtro é um ótimo material para testes de triagem mesmo apresentando resultados falsos positivos. Os leucócitos, de outra forma, talvez sejam uma alternativa para o diagnóstico bioquímico final. Tal

afirmação somente poderá ser confirmada após a comparação, da atividade da enzima, em leucócitos com fibroblastos de pacientes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e Genzyme do Brasil pelo apoio financeiro prestados e aos doadores do banco sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e médicos pelas amostras de sangue e biópsias de pele utilizadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

[1] Ellaway CJ, Wilcken B, Christodoulou. Clinical approach to inborn errors of metabolism presenting in the newborn period. *J. Paediatr. Child Health* 2002; 38:511-17.

[2] Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, *et al.* Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess*, 1997; 1:1-202.

[3] Scriver CR. Garrod's foresight; our hindsight. *J Inher Met Dis* 2001; 24(2):93-116.

[4] Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New-York: McGraw-Hill; 2001.

[5] Hirschhorn R, Reuser A.J.J. Glycogen storage disease type II: acid α -glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver SR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Ed). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp.3389–3420.

[6] Adam BW, Orsini Jr. JJ, Martin M, Hall EM, Zobel SD, Caggana M, *et al.* The preparation and storage of dried-blood spot quality control materials for lysosomal storage disease screening tests. *Clin Biochem* 2011; 44(8-9):704-10.

[7] Nakamura K, Hattori K, Endo F. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders. *Am J Med Gen C Semin Med Gen* 2011; 157:63–71.

[8] Wenger DA, Coppola S, Liu SL. Insights Into the Diagnosis and Treatment of Lysosomal Storage Diseases. *Arch Neurol* 2003; 60:322-8.

[9] Manger, B. Lysosomal storage diseases. *Z Rheumatol* 2010; 69(6):527-38.

[10] Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281:249-54.

[11]De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, *et al.* Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 2009; 55(1):158–64.

[12]Kallwass H, Carr C, Guerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, *et al.* Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of α -glucosidase activities in dried blood spots. *Mol Genet Met* 2007; 90(4):449-52.

[13]Lukacs Z, Cobos PN, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, *et al.* Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes - possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(1):43-50.

[14]Van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's Disease. *Lancet* 2008; 382:1342-53.

[15]Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, *et al.* Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Mol Genet Met* 2008; 93(3):275-81.

[16]Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2004; 347(1-2):97-102.

[17]Shigueto S, Katafuchi T, Okada Y, Nakamura K, Endo F, Okuyama T, *et al.* Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Met* 2011; 103(1):12-7.

[18]Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, *et al.* Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 372:98-102.

- [19]Li Y, Scott R, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, *et al.* Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 2004; 50(10):1785-96.
- [20]Rodrigues MD, de Oliveira AC, Müller KB, Martins AM, D'Almeida V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spot: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta* 2009; 406:86-8.
- [21]Gasparotto N, Tomanin R, Frigo AC, Niizawa G, Pasquini E, Blanco M, *et al.* Rapid diagnostic testing procedures for lysosomal storage disorders: α -glucosidase and β -galactosidase assays on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2009; 402:38-41.
- [22]Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MPS, Coelho JC. Influence of pre-analytical factors on α -galactosidase A, arylsulfatase B and α -glucosidase activities measured on dried blood spots on filter paper. *Clin Biochem* 2011; 44(10-11):922-26.
- [23]Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods os isolating of isolating leukocytes. *Blood* 1956; 11(5):436-54.
- [24]Coelho JC, Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases. *Genetics and Molecular Biology* 2000; 23(2):269-71.
- [25] Butterworth J, Droadhead DM. Diagnosis of Pompe's disease in cultured skin fibroblasts and primary amniotic fluid cells using 4-methylumbelliferyl-alpha-D-glucopyranoside as substrate. *Clin Chim Acta* 1977; 78(2):335-42.
- [26]Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.

[27] Van Diggelen OP, Oemardien LF, Van der Beek NA, Kroos MA, Wind HK, Voznyi YV, *et al.* Enzyme analysis for Pompe disease in leukocytes; superior results with natural substrate compared with artificial substrates. *J Inherit Met Dis* 2009; 32(3):416-23.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1

Atividade da GAA em sangue colhido em papel filtro (nmol/20h/mL) de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ comparado com o controle (teste t de Student). Valor de referência: 5-15 nmol/20h/mL

Figura 2

Atividade da GAA em fibroblastos (nmol/h/mg prot) de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ comparado com o controle (teste t de Student). Valores de referência 30-150nmol/h/mg de proteína.

Figura 2

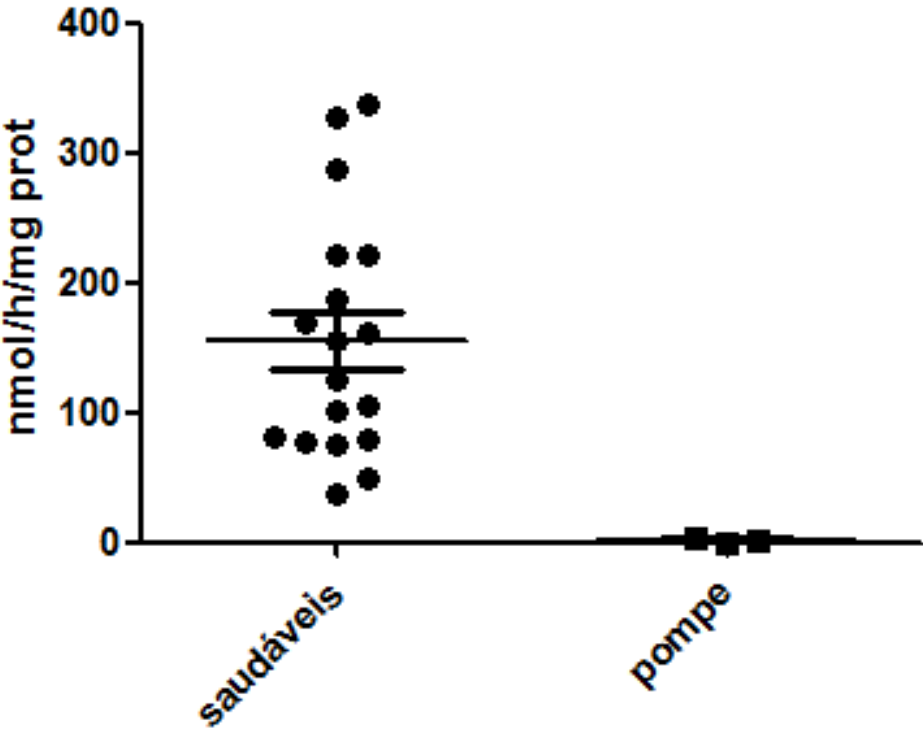


Tabela 1. Atividade da enzima alfa-glicosidase ácida em amostras de SPF, fibroblastos e leucócitos de controles saudáveis e pacientes com Doença de Pompe. Valores de referência – SPF: 5-15nmol/20h/mL; Fibroblastos: 30-150nmol/h/mg prot; Leucócitos: 1-6 nmol/h/mg prot.

Contr.	SPF	Fibroblastos	Contr.	Leucócitos	Fibroblastos	Contr.	SPF	Leucócitos
A	8,8	337,0	A	5,8	337,0	A	8,8	5,8
B	8,8	533,0	B	5,8	533,0	B	8,8	5,8
C	17,1	81,7	C	6,3	81,7	C	17,1	6,3
D	18,5	326,9	D	6,6	326,9	D	18,5	6,6
E	17,9	236,4	E	9,9	236,4	E	17,9	9,9
F	21,1	188,0	F	11,0	188,0	F	21,1	11,0
G	0,49	50,0				M	7,8	22,8
H	3,6	75,5				N	11,1	13,6
I	3,2	169,8				O	5,5	22,4
J	4,2	79,9				P	16,0	16,8
K	9,5	36,7				Q	3,4	5,9
L	3,8	220,4				R	14,4	10,6
						S	4,2	7,1
						T	4,2	8,9
						U	10,8	17,3
						V	12,8	10,3
						X	6,0	8,2

Paciente	SPF	Fibroblastos	Paciente	Leucócitos	Fibroblastos	Paciente	SPF	Leucócitos
P1	0,25	0,93	P1	0,53	0,93	P1	0,25	0,53
P2	0,0	3,2	-	-	-	-	-	-

ANEXO

Journal Clinical Biochemistry

Clinical Biochemistry publishes articles relating to the applications of molecular biology, biochemistry, chemistry and immunology to clinical investigation and to the diagnosis, therapy, and monitoring of human disease. Manuscripts are categorized as Analytical or Clinical Investigations and may be offered as Full Papers or as Short Communications. Critical Reviews are welcome, but contributors are encouraged to contact the Editor-in-Chief to avoid conflict with other forthcoming Reviews.

Types of paper

Full-length research articles, Short communications, Case Reports, Critical Reviews.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the Clinical Biochemistry online submission system, <http://ees.elsevier.com/club>.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

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

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>, published by the International Committee of Medical Journal Editors.

This must be stated at an appropriate point in the article

Please note: Clinical Biochemistry does not accept submission of papers based on animal studies.

STARD initiative Clinical Biochemistry supports the STARD initiative on reporting of diagnostic accuracy. <http://www.stard-statement.org>

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript

and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

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

Funding body agreements and policies

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

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

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

Referees

A minimum of six suitable potential reviewers (please provide their name, email addresses, and institutional affiliation). When compiling this list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers should be from another country than the authors'; and they should not have recent (less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

Types of submission and criteria

- Original Research Communications (designated as one of two categories: Analytical or Clinical Investigation) may be offered as Full Papers or as Short Communications. The latter format is recommended for presenting technical evaluations and short clinical notes, comprising up to 1,500 words of text, 10 references, and two illustrative items (Tables and/or Figures).
- Case Reports will be accepted only where they provide novel insight into disease mechanisms or diagnostic applications.
- Critical Reviews will be welcome but prospective authors are strongly advised to seek authorization from the Editor-in-Chief to avoid conflict with scheduled reviews invited by the Editorial Board. They should address new topics or trends in clinical biochemistry or related fields.
- Consensus recommendations or guidelines on the use of laboratory test for clinical practice will be considered if they are compiled by a recognized organization or expert panel (e.g. IFCC, IUPAC, AACC, etc). Please contact the Editor-in-Chief for consideration. The responsibility for such material remains with the originating body.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. 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 an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Patients

If human subjects were used in the experiment please make a statement to the effect that this study has been cleared by your Institution Ethics Review Board for human studies and that patients have signed an informed consent. These are required by standards.

Experimental

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

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

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case

superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

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

Abstract

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

Page 2 of the typescript should be reserved for the abstract which should be presented in a structured format and should not exceed 150 words for Full Papers, or 75 words for Short Communications. The following headings should be included followed by a colon: a) Objectives: b) Design and Methods: c) Results: d) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords for full papers, or 5 keywords for Short Communications, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Please use terms from the most current issue of medical subject headings of Index Medicus. The key words should

cover precisely the contents of the submitted paper and should give readers sufficient information as to the relevance of the paper to his/her particular field. 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.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors 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. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.

- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

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

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

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

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like 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, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will

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

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

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

Tables

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

The Editor-in-Chief, on accepting a manuscript, may recommend that additional tables containing important backup data, too extensive to be published in the article, may be published as supplementary material (see below) or deposited with the National Auxiliary Publications Service or made available by the author(s). In that event, an appropriate statement will be added to the text. Submit such tables for consideration with the manuscript.

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 and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2000) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Abbreviations and units

Standard abbreviations as listed in the Council of Biology Editors Style Manual may be used without definition. Use non-standard abbreviations sparingly, preceding their first use in the text with the corresponding full designation. Use units in conformity with the standard International System (SI) of units.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can

be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

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

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

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

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a

document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTOR INQUIRIES

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