

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

KELLEN RONÇANI SIMON

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA
FENILALANINA EM CÓRTEX CEREBRAL E SANGUE DE RATOS JOVENS**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.

KELLEN RONÇANI SIMON

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA
FENILALANINA EM CÓRTEX CEREBRAL E SANGUE DE RATOS JOVENS**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade do Extremo
Sul Catarinense para obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia F. Schuck

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.

Dedico este trabalho, a minha orientadora e amiga Patrícia Fernanda Schuck. Agradeço por sua confiança, credibilidade, compreensão e paciência durante essa jornada, e, pelo mútuo aprendizado proporcionado a mim. Nossa caminhada não termina aqui, em breve voltarei e estaremos com um novo projeto. Continue sendo essa pessoa maravilhosa e iluminada. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Muito obrigada!

ARTIGO CIENTÍFICO

Investigação dos efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* da fenilalanina em córtex cerebral e sangue de ratos jovens

Simon, KR; Scaini, G; Damiani, AP; Leffa, DD; Ferreira, GC; Streck, EL; Andrade, VM;
Schuck, PF

Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Inherited Metabolic Disease*.

Investigação dos efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* da fenilalanina em córtex cerebral e sangue de ratos jovens

*Simon, KR^a; Scaini, G^a; Damiani, AP^b; Leffa, DD^b; Ferreira, GC^a; Streck, EL^a; Andrade, VM^b; Schuck, PF^a

^aLaboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

^bLaboratório de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

Autor correspondente: PF Schuck, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Tel: +55 48 34312539. Fax: +55 48 34312671. E-mail: schuck@unesc.net

Abreviações

DNA: Ácido desoxirribonucleico; **EC:** Comissão de Enzimas - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular; **FD:** Frequência de dano; **ID:** Índice de dano; **PAH:** Fenilalanina hidroxilase; **Phe:** Fenilalanina; **p-Cl-Phe:** p-cloro-fenilalanina; **PKU:** Fenilcetonúria; **OMIM:** Base de Dados Online de Herança Mendeliana em Homem.

RESUMO

O acúmulo de fenilalanina (Phe) no cérebro ocorre na fenilcetonúria, doença causada pela deficiência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase. Os pacientes fenilcetonúricos apresentam sintomas neurológicos graves. Entretanto os mecanismos fisiopatológicos dos danos cerebrais ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, é possível postular que a fenilalanina possa provocar efeitos neurotóxicos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o grau de dano ao DNA em córtex cerebral e sangue de ratos que receberam administração aguda de Phe e/ou p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe), um inibidor da enzima deficiente. Os animais receberam uma única injeção subcutânea de Phe (5,2 μ mol/g de peso corporal), p-Cl-Phe (0,9 μ mol/g de peso corporal) ou a combinação de Phe e p-Cl-Phe nas mesmas doses. O grupo controle recebeu solução salina no mesmo volume. Os animais foram mortos 1 hora após a administração dos metabólitos. Os danos ao DNA no córtex cerebral foram analisados através do Ensaio Cometa pela medida do índice de dano (ID) e da frequência de dano (FD). Observamos que a Phe e p-Cl-Phe isoladamente não induziram dano ao DNA. Por outro lado, a associação de Phe e p-Cl-Phe causou um aumento no ID e FD em comparação ao grupo controle, sugerindo que essa associação induz dano ao DNA. Nossos resultados fornecem evidências de que danos no DNA podem contribuir para o entendimento dos sintomas neurológicos observados em pacientes afetados por fenilcetonúria.

Palavras-chave: dano ao DNA, fenilalanina, fenilcetonúria.

1 INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU, OMIM 261600) é um dos mais frequentes e estudados erros inatos do metabolismo de aminoácidos. É uma doença genética de caráter autossômico recessivo com prevalência de aproximadamente 1:10.000. É caracterizada bioquimicamente pela ausência ou deficiência da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH, EC 1.14.16.1) ou, mais raramente, de seu cofator, a tetraidrobiopterina (BH₄), resultando no acúmulo de fenilalanina (Phe) e seus metabólitos no sangue e tecidos dos pacientes (Scriver and Kaufman 2001). Além disso, ocorre a diminuição da concentração do produto tirosina no organismo (Lehninger et al 2006).

As principais manifestações clínicas da PKU correspondem a alterações neurológicas. Embora muitos estudos venham sendo realizados, os mecanismos da neurotoxicidade na PKU ainda permanecem obscuros, mas há um consenso de que a Phe, em concentrações elevadas, é uma molécula nociva (Scriver and Kaufman 2001). A Phe parece influenciar diversos mecanismos cerebrais como a excitabilidade neural, a condução axonal e a velocidade na transmissão sináptica (Burri et al 1990; Fernstrom 1994). O tratamento da PKU consiste em uma dieta hipoprotéica, restrita em Phe, enriquecida com micronutrientes essenciais (Przyrembel and Bremer 2000). O grau de retardo mental está diretamente relacionado aos níveis de Phe. O tratamento deve ser iniciado precocemente e ser continuado ao longo da vida adulta para evitar o avanço das consequências neuropsiquiátricas características (Zemam et al 1996).

Modelos animais de PKU, induzidos através da administração de Phe associada à p-clorofenilalanina, um inibidor da enzima PAH, têm sido uma importante ferramenta no estudo dos efeitos da Phe, pois mimetizam a características dos pacientes fenilcetonúricos (Streck et al 2000). Estudos demonstraram que altos níveis de Phe inibem a atividade da enzima creatina quinase *in vitro* e reduzem a atividade da enzima *in vivo* (Costabeber et al 2003), inibem a atividade da acetilcolinesterase em membrana de eritrócitos de pacientes com PKU (Tsakiris et al 2002), a captação de glicose no cérebro (Rodrigues et al 1990), a transferência de energia (Lütz et al 2003), a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (Wyse et al 1995) e da piruvatoquinase (Feksa et al 2002).

Além disso, foi demonstrado em um estudo com pacientes fenilcetonúricos, através da medida de parâmetros de estresse oxidativo, que há estimulação da lipoperoxidação, deficiência na capacidade antioxidante do tecido e um aumento da produção de espécies reativas (Sirtori et al 2005). Sabe-se que essas espécies altamente reativas têm o potencial de

oxidar moléculas como DNA, proteínas e lipídios, causando dano e disfunção celular (Halliwell and Gutteridge 2007). Recentemente, Sitta e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes fenilcetonúricos não-tratados apresentam um maior índice de dano ao DNA em sangue periférico, o que parece estar associado a níveis elevados de Phe. Entretanto, nada se sabe sobre o efeito genotóxico de elevados níveis de Phe sobre o cérebro. Portanto, este trabalho investigou os efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* da Phe em córtex cerebral e sangue periférico de ratos jovens.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). A Phe e p-Cl-Phe foram dissolvidas no dia dos experimentos e o pH das soluções foi ajustado para 7,4.

2.2 Animais

Foram utilizados vinte e cinco ratos Wistar machos de trinta dias de vida fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. A utilização dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo 67/2010.

2.3 Estudos in vivo

Os animais foram divididos em quatro grupos, constituídos de cinco animais por grupo. No grupo 1 (controle), os animais receberam uma injeção subcutânea de NaCl 0,9 g%; no grupo 2, os animais receberam uma injeção subcutânea de Phe na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal; no grupo 3, os animais receberam uma injeção subcutânea de p-Cl-Phe na dose

de 2,4 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal; no grupo, 4 os animais receberam uma única injeção subcutânea de uma solução contendo Phe na dose de 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal associada a uma solução de p-Cl-Phe na dose de 2,4 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal.

2.4 Preparação das amostras para análise

Os animais sofreram eutanásia uma hora após a injeção, por decapitação com guilhotina e sem anestesia, o sangue foi armazenado em tubos descartáveis previamente heparinizados e mantidos. A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 8°C. O córtex cerebral foi dividido e retirado o excesso de sangue dos vasos externos.

2.5 Estudos in vitro

Foram utilizados cinco animais sem prévio tratamento. Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia, o sangue foi retirado e armazenado até o momento da incubação em tubos descartáveis previamente heparinizados. A caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado. O córtex cerebral foi limpo e dividido, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos. Fatias de córtex cerebral e amostras de sangue periférico foram incubadas na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de Phe (0,5; 1,0 ou 2,5 mM) durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as amostras foram colocadas em gelo e mantidas ao abrigo da luz até o momento da realização da análise.

2.6 Descrição da técnica utilizada

2.6.1 Ensaio Cometa:

O Ensaio Cometa seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (Tice et al., 2000; Silva et al., 2000). As lâminas foram preparadas através da mistura de 5 μL de sangue ou córtex cerebral com 95 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), onde essa mistura (células e agarose) foi depositada sobre uma lâmina de microscopia previamente coberta por uma película de 500 μL de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e adicionado uma lamínula sobre a mistura. As amostras foram colocadas na

geladeira por 5 a 10 minutos para solidificação da amostra. Após a solidificação, as lamínulas foram suavemente removidas e as lâminas submersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0-10,5), para exposição do núcleo celular, por tempo mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. Sequencialmente, as lâminas foram incubadas no tampão alcalino (pH > 13) por 20 minutos, com temperatura aproximada de 4°C. Após isso, as lâminas passaram por uma eletroforese durante 15 minutos a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA, e então neutralizadas com Tris 0,4M (pH 7,5). Após a neutralização, as lâminas foram colocadas na estufa a 37°C para posterior secagem durante 1 hora e 30 minutos para iniciar-se a coloração com nitrato de prata. Após a secagem, as lâminas foram distribuídas em cubetas com solução fixadora (ácido tricloroacético 15% p/v, sulfato de zinco 5% p/v, glicerol 5% v/v) por 10 minutos e então, colocadas novamente na estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos. As lâminas foram hidratadas durante 5 minutos com água destilada, e em seguida coradas com a solução de coloração (carbonato de sódio 5% p/v, nitrato de amônio 0,1% p/v, nitrato de prata 0,1% p/v, ácido tungstosílico 0,25% p/v, formaldeído 0,15% v/v, preparada no escuro), onde as cubetas foram mantidas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e depois submersas em solução *stop* (ácido acético 1% v/v) durante 5 minutos, e então lavadas novamente por 3 vezes com água destilada e colocadas novamente na estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos para posterior análise.

Imagens de 100 células selecionadas ao acaso foram analisadas de cada amostra usando-se microscópio óptico em aumento de 100x ou 400x. O dano apresentado foi avaliado classificando-se cada célula de acordo com as cinco classes de dano existentes, que se inicia em dano 0 (= ausência de dano) e vai até o dano 4 (= máximo de dano) identificados através do tamanho e forma. Então, os valores obtidos para cada amostra foram agrupados em escala de 0 (0x100) a 400 (4x100). A Frequência de dano (FD) foi calculada para cada amostra baseada no número de células com dano.

2.7 Análise estatística

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos bioquímicos das concentrações testadas. As análises

estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 16.0. Foi considerada diferença significativa quando o valor de $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Estudos in vivo

Primeiramente, avaliamos os efeitos de altas concentrações de Phe obtidas através da administração deste aminoácido e/ou da p-Cl-Phe. Os dados estão apresentados na forma dos dois parâmetros do ensaio cometa, índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). A Figura 1 apresenta os resultados de ID em córtex cerebral de ratos submetidos à administração de NaCl 0,9 % (controle), Phe 5,2 $\mu\text{mol/g}$, p-Cl-Phe 2,4 $\mu\text{mol/g}$ ou da associação de Phe 5,2 $\mu\text{mol/g}$ e p-Cl-Phe 2,4 $\mu\text{mol/g}$. Podemos observar que os grupos que receberam Phe e p-Cl-Phe isolados ou em associação obtiveram valores de ID significativamente maior quando comparado ao grupo controle, indicando dano. A Figura 2 mostra a FD resultante do ensaio cometa, em que observamos os mesmos resultados de ID, confirmando, assim, os efeitos genotóxicos causados em córtex cerebral pelo aumento das concentrações de Phe nos tecidos.

Os efeitos de altas concentrações de Phe em sangue foram semelhantes aos apresentados em córtex cerebral. As Figuras 3 e 4 demonstram o aumento dos valores de ID e FD, respectivamente, ocasionados pela hiperfenilalaninemia obtida através da administração de Phe e/ou da p-Cl-Phe.

3.2 Estudos in vitro

Nos experimentos *in vitro*, amostras de córtex cerebral de ratos sem prévia manipulação foram incubadas por 30 minutos na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de Phe (0,5; 1,0; 2,5 mM). As Figuras 5 e 6 demonstram os efeitos das diferentes concentrações de Phe sobre o DNA em córtex cerebral. Podemos observar que as concentrações de 1 e 2,5 mM de Phe levaram ao aumento dos valores de ID e FD.

Em relação ao efeito de diferentes concentrações de Phe, observamos que houve uma tendência ao aumento dos valores de ID e FD na presença de 0,5 mM, a concentração mais

baixa utilizada neste estudo. Entretanto, não houve diferença estatística, como demonstrado pelas Figuras 7 e 8.

4 DISCUSSÃO

Os pacientes acometidos por fenilcetonúria apresentam sintomas essencialmente cerebrais, embora enzima PAH, deficiente na doença, seja hepática (Scriver and Kaufman 2001). O acúmulo de Phe nos tecidos dos pacientes parece ser a causa do dano cerebral. Muitos estudos já demonstraram efeitos tóxicos da Phe em animais e em pacientes fenilcetonúricos. Vários autores reportam indução de estresse oxidativo, tanto em modelos animais de hiperfenilalaninemia quanto em pacientes afetados por PKU (Sierra et al 1998; Hagen et al 2002; Schulpis et al 2003; Artuch et al 2004; Sitta et al 2009a; Moraes et al 2010; Sanayama et al 2011). Sitta e colaboradores (2009b) demonstraram recentemente um aumento de dano ao DNA em leucócitos de pacientes fenilcetonúricos, sugerindo que este dano seria causado pelo aumento dos níveis de Phe e seus metabólitos no sangue e nos tecidos. Considerando que um estado de estresse oxidativo pode levar ao dano oxidativo em ácidos nucleicos, que o mecanismo pelo qual pacientes acometidos por PKU apresentam maiores índices de dano ao DNA, e que ainda é desconhecido o efeito de altas concentrações de Phe em tecidos cerebrais, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* de altas concentrações de Phe em córtex cerebral e sangue periférico de ratos jovens.

Deve-se enfatizar que o DNA é um importante alvo de oxidação, levando à formação de produtos que podem induzir mutações, perda de heterozigose, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e neoplasias (Halliwell e Gutteridge 2007).

Inicialmente, observamos que há um aumento de dano ao DNA tanto em córtex cerebral quanto em sangue de animais submetidos a um modelo experimental de PKU induzido quimicamente através da administração de Phe e de p-Cl-Phe, um inibidor da enzima PAH, quando comparados ao grupo controle, sugerindo que hiperfenilalaninemia leva ao dano de DNA tanto em cérebro quanto em sangue. Tais resultados confirmam os dados obtidos em pacientes por Sitta e colaboradores (2009b).

Para verificar se possíveis metabólitos secundários da Phe pudessem realizar esses efeitos encontrados *in vivo*, avaliamos o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de Phe sobre parâmetros de dano ao DNA em córtex cerebral e sangue de animais. Os efeitos *in vivo*

se repetiram em fatias de córtex cerebral incubadas *in vitro* na presença de altas concentrações de Phe (1 e 2,5 mM). Tais resultados indicam que a Phe parece ser o metabólito responsável pelo dano ao DNA, visto que a PAH, enzima que metaboliza a Phe, é hepática e, portanto, não está presente no meio de incubação.

Interessantemente, não houve dano significativo ao DNA em alíquotas de sangue incubadas com Phe, embora haja uma tendência a aumento de dano na concentração mais baixa estudada (0,5 mM). Tal fato pode ser explicado por morte celular induzida pelas altas concentrações de Phe e secundária ao dano ao DNA por ela causado. Para comprovar tal fato, é necessária a investigação de parâmetros que indiquem morte celular, tal como dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase extracelular, visto que esta enzima é liberada em caso de morte da célula (Burtis et al 2008). Cabe ressaltar que o cérebro apresenta maior suscetibilidade a danos ao DNA, visto que seus mecanismos de reparos são menos efetivos e suas defesas antioxidantes são reduzidas em comparação a outros tecidos (Fairbairn et al 1995; Schulpis et al 2005).

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a Phe apresenta um importante efeito genotóxico em sangue periférico e cérebro de ratos. Considerando que dano oxidativo a lipídeos e proteínas foi previamente descrito em modelos animais e pacientes afetados por PKU, é possível hipotetizar que o dano ao DNA encontrado neste presente estudo seja consequência de uma produção excessiva de espécies reativas causada pela Phe (Halliwell e Gutteridge 2007). Espécies reativas podem levar a dano ao DNA por ataque direto às bases púricas e piridínicas e/ou ao açúcar desoxirribose, resultando em formação de adutos de DNA e quebra das fitas de DNA (Fairbairn et al 1995).

Concluindo, o presente trabalho provê evidências experimentais de que altas concentrações de Phe podem levar a dano ao DNA, corroborando assim resultados prévios que demonstram dano ao DNA e leucócitos de pacientes fenilcetonúricos (Sitta et al 2009b). Portanto, esses resultados aqui demonstrados poderiam colaborar, ao menos em parte, para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos apresentados por pacientes fenilcetonúricos.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu auxílio financeiro de projetos aprovados PIBIC/UNESC, CNPq e pelo prêmio Para Mulheres na Ciência, promovido pela L'Oreal/Academia Brasileira de Ciências/UNESCO.

REFERÊNCIAS

- Artuch R, Colome C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, Campistol J, Ugarte D, Vilaseca MA (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37: 198–203.
- Burri R, Stefen C, Stiger S, Brodbeck U, Colombo JP, Herschkowitz N (1990) Reduced myelinogenesis and recovery in hyperphenylalaninemic rats. *Mol Chem Neuropathol* 13: 57–69.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (2008) *Tietz Fundamentos de Química Clínica*. São Paulo: Elsevier.
- Costabeber E, Kessler A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci*: 21: 111–116.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 35–59.
- Feksa LR, Cornelio AR, Rech VC, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wajner M, Wannmacher CM (2002) Alanine prevents the reduction of pyruvate kinase activity in brain cortex of rats subjected to chemically induced hyperphenylalaninemia. *Neurochem* 27: 947–952.
- Fernstrom JD (1994) Dietary amino acids and brain function. *J Am Diet Assoc* 94: 71–77.
- Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS (2002) Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1586: 344–352.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in Biology and medicine*. New York: Oxford University Press, 220–236.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2006) *Princípios de bioquímica*. 4^a ed. São Paulo: Sarvier.

Lütz MG, Feksa LR, Wyse ATS, Dutra-Filho CSD, Wajner M, Wannmacher CMD (2003) Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Met Brain Dis* 18: 87–94.

Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* May 15, 292: 89–95.

Przyrembel H, Bremer HJ (2000) Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159: 129–135.

Rodrigues NR, Wannmacher CMD, Dutra-Filho CS, Pires RF, Fagan PR, Wajner M (1990) Effect of phenylalanine, p-chlorophenylalanine na α -methylphenylalanine on glucose uptake in vitro by the brain of young rats. *Biochem Soc Trans* 18: 419–428.

Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y (2011) Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* Mar 29.

Schulpis KH, Tsakiris S, Karikas GA, Moukas M, Behrakis P (2003) Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *Eur J Clin Nutr* 57: 282–287.

Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I (2005) Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem* 38: 239–242.

Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1667–1724.

Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A (1998) Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 276: 1–9.

Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B (2000) An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol* 23: 241–245.

Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR (2005) Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys* 1740: 68–73.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Biancini GB, Vargas PR, de Souza CF, Netto C, Wajner M, Vargas CR (2009) Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Dev Neurosci* 27: 243–7.

Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IVD, Wajner M, Vargas CR (2009) Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res* 679: 13–16.

Streck EL, Edom PT, Noriler ME, Borges LF, Pontes ZL, Parolo E, Dutra-Filho CS, Wannmacher CMD, Wyse ATS (2000) Effect of phenylalanine and p-chlorophenylalanine on Na^+ , K^+ -ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis* 15: 105–114.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 306–221.

Tsakiris S, Schulpis KH, Tjamouranis J, Michelakaksi H, Karikas GA (2002) Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from patients with phenylketonuria. *Clin Biochem* 35: 615–619.

Wyse ATS, Bolognesi G, Brusque AM, Wajner M, Wannmacher CMD (1995) Na⁺,K⁺-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med Sci Res* 23: 261–262.

Zeman J, Pijackova A, Behulova J, Urge O, Saligova D, Hyanek J (1996) Intellectual and school performance in adolescents with phenylketonuria according to their dietary compliance. *Eur J Pediatr* 155: 56–58.

Legendas das Figuras

Figura 1. Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 2. Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 3. Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 4. Efeito da administração aguda de fenilalanina (Phe) e p-clorofenilalanina (p-Cl-Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 5. Efeito *in vitro* da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 6. Efeito *in vitro* da fenilalanina (Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em córtex cerebral de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 7. Efeito *in vitro* da fenilalanina (Phe) sobre o índice de dano ao DNA (ID) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 8. Efeito *in vitro* da fenilalanina (Phe) sobre a frequência de dano ao DNA (FD) em sangue periférico de ratos jovens. Os dados representam média \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata e estão expressos em unidades arbitrárias (UA). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (ANOVA).

Figura 1.

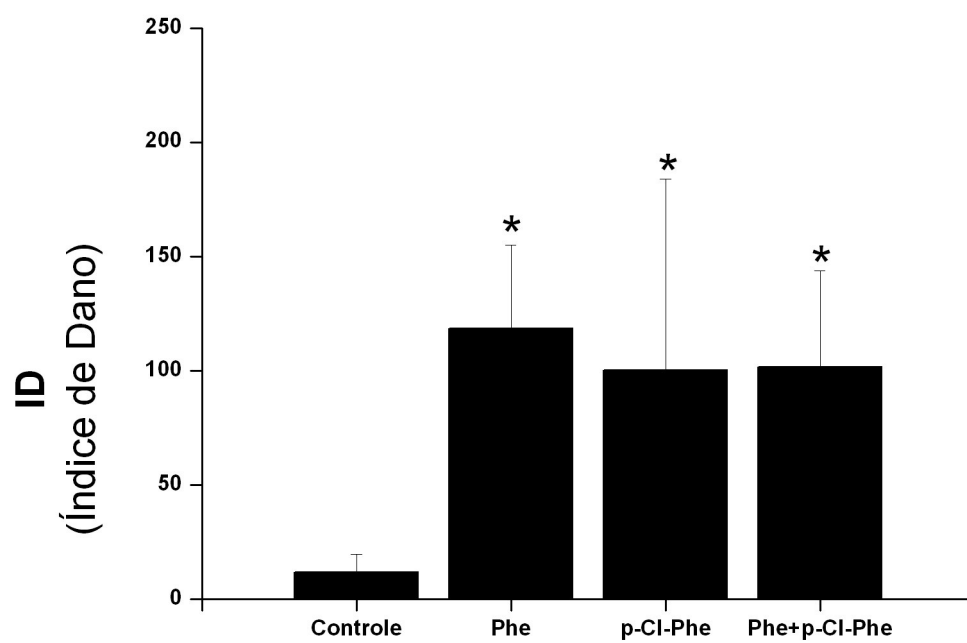


Figura 2.

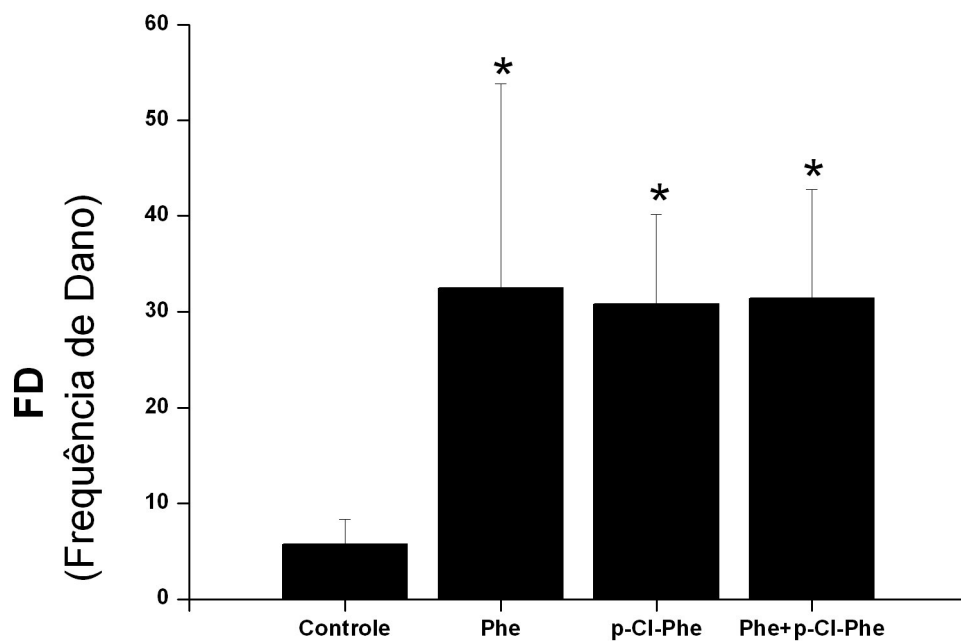


Figura 3.

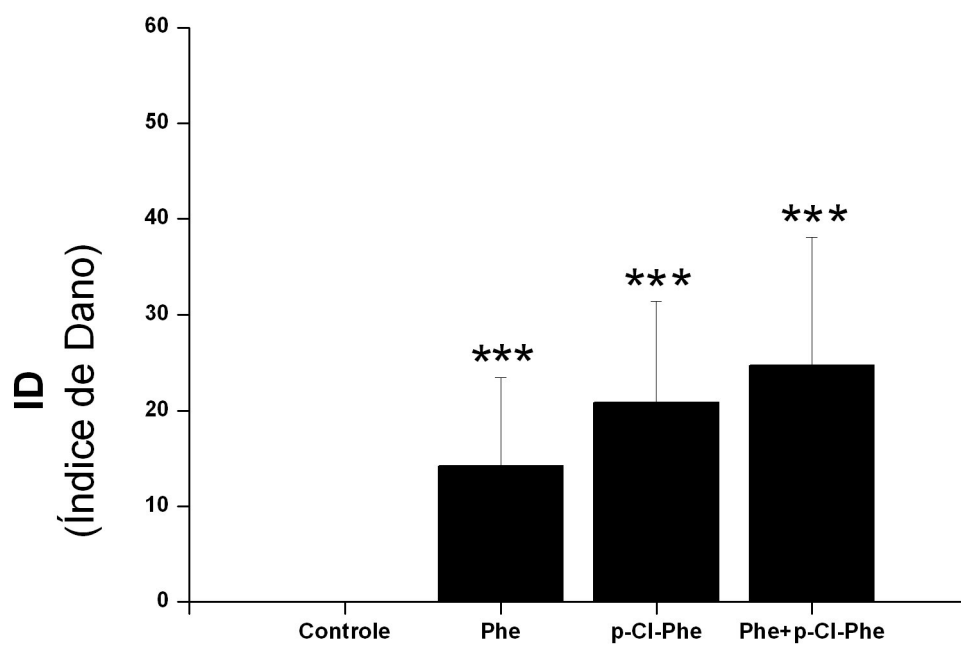


Figura 4.

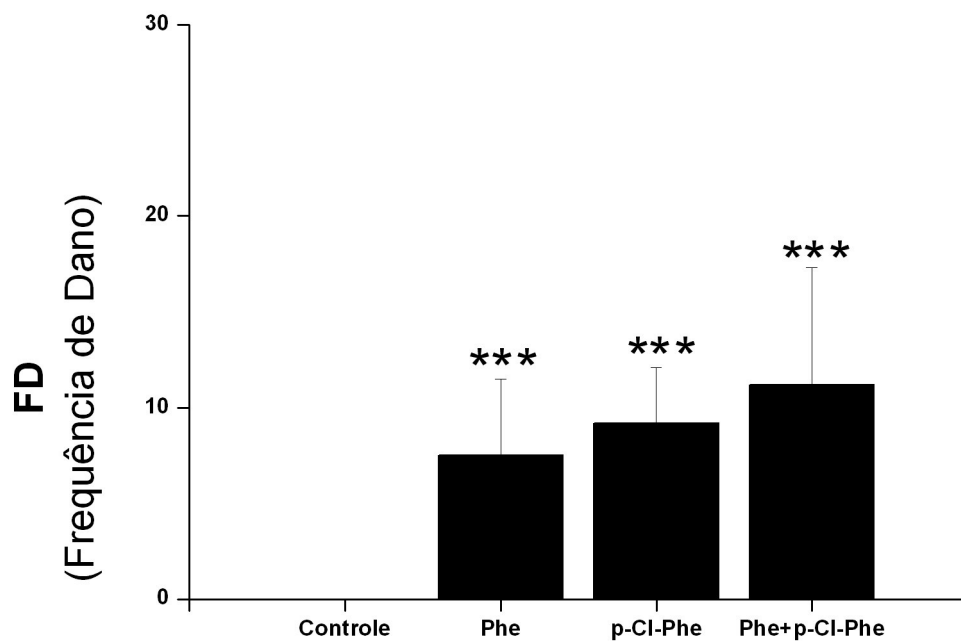


Figura 5.

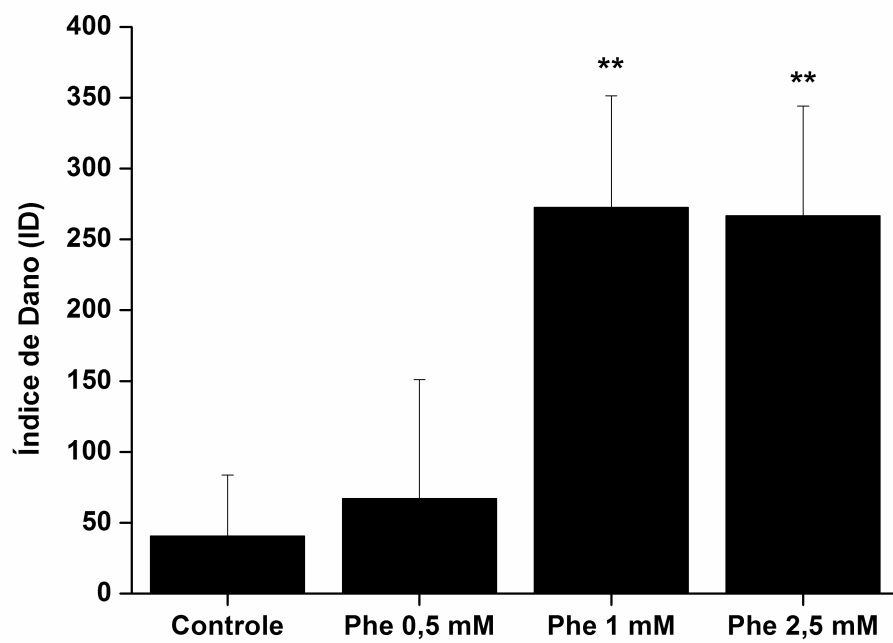


Figura 6.

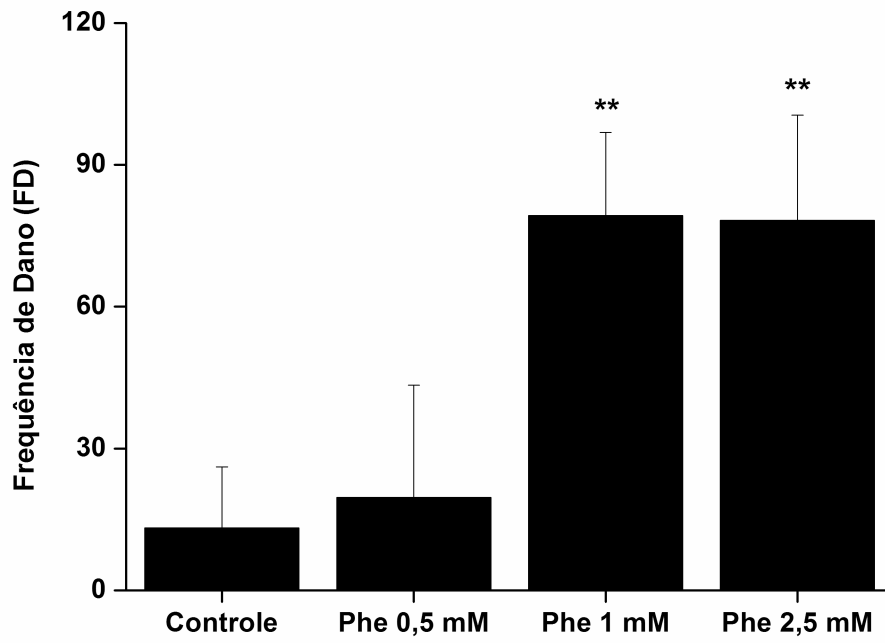


Figura 7.

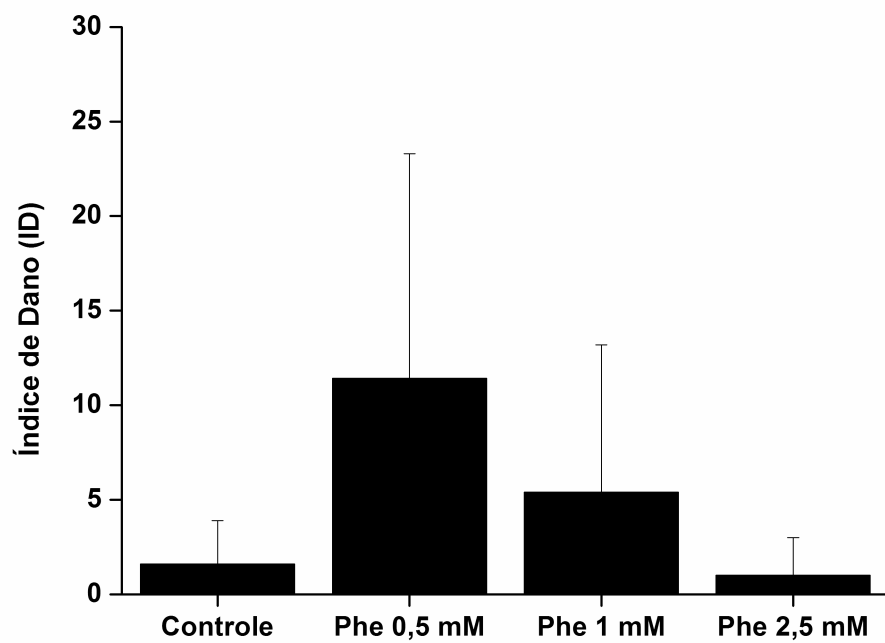
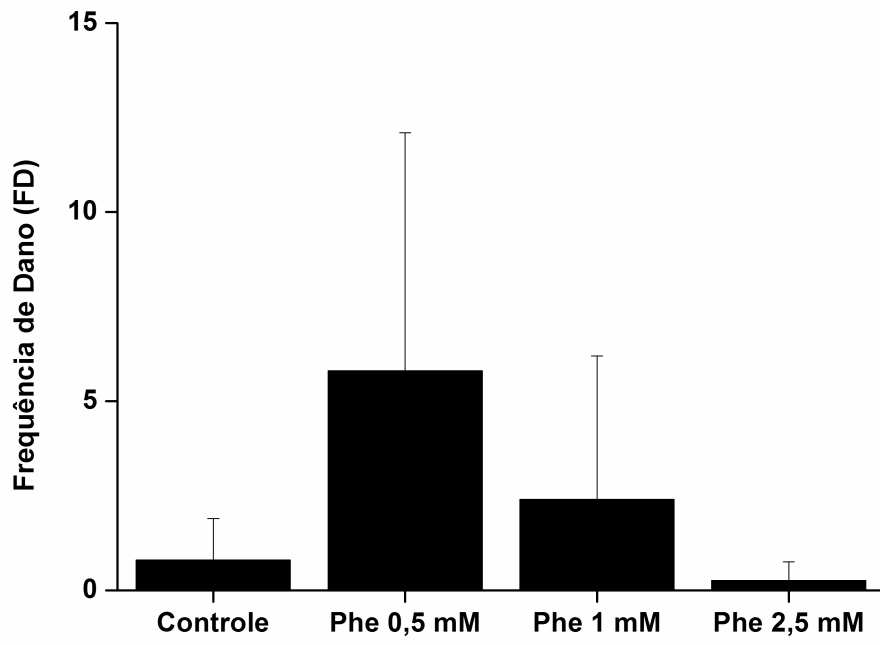


Figura 8.



ANEXO I – INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Periódico *Journal of Inherited Metabolic Disease*

JIMD – Journal of Inherited Metabolic Disease

Aims and Scope

The JIMD is the official journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, SSIEM. By enhancing communication between workers in the field throughout the world, the JIMD aims to improve the management and understanding of inherited metabolic disorders. It publishes results of original research and new or important observations pertaining to any aspect of inherited metabolic disease in humans and higher animals. This includes clinical (medical, dental and veterinary), biochemical, genetic (including cytogenetic, molecular and population genetic), experimental (including cell biological), methodological, theoretical, epidemiological, ethical and counselling aspects. The JIMD also reviews important new developments or controversial issues relating to metabolic disorders and publishes reviews and short reports arising from the Society's annual symposia. A distinction is made between peer-reviewed scientific material that is selected because of its significance for other professionals in the field, and non-peer-reviewed material that aims to be important, controversial, interesting or entertaining ("Extras").

The Journal of Inherited Metabolic Disease exists as two sister publications which are served by a single Editorial Team and a single manuscript submission and review process: the traditional print and online journal "JIMD" and the online-only "JIMD Reports". The latter publishes scientifically sound research findings or clinical observations that warrant communication in the peer-reviewed literature but are of more limited interest to the readers. In addition to full electronic publication as "JIMD Reports", the abstracts of these articles are also printed in the non-online section of the "JIMD" to reach the widest possible readership. All other types of articles are published electronically and in print in the JIMD.

Scientific contributions

Full Articles

The JIMD welcomes scientific contributions for publication as printed full articles in the following categories:

- **Original Articles:** Important manuscripts that may be expected to influence or change clinical or research practice with regard to inherited metabolic disorders. Original articles may include comprehensive studies on disease features in groups of patients, important novel information on a disease or relevant research findings. Exceptional case reports that are judged to be of general interest to the readers may also be accepted as original articles. The editors may reject submitted manuscripts

as original articles but invite revision or resubmission for publication as Reports in “JIMD Reports”. Anecdotal observations may also be submitted as “Extras”.

- **Rapid Communications:** Highly competitive and timely manuscripts; please discuss this with the editors: editor@jimd.org.

- **Reviews:** Concise summaries of metabolic pathways, specific disorders, methods, treatment options etc.

- **Metabolic Dissertations:** The JIMD invites all researchers who have completed a Ph.D. or M.D. thesis in the field of inborn errors of metabolism to submit a comprehensive review of the topic of their thesis. The article should not focus solely on the research findings but should cover all relevant information in the respective field. Such reviews preferably (but not necessarily) have a single author (other contributors should be acknowledged) and will be published with a photograph of the investigator.

All authors are invited to provide a colour picture that may be used for the front cover of the issue in which the article appears.

Images in Metabolic Medicine

The Editors will consider clear and interesting clinical pictures or other types of images (e.g. laboratory results or observations) submitted with a descriptive paragraph of up to 250 words. Prints, slides, or electronic copy are all acceptable. Authors must obtain informed consent for publication of patient-related materials. Case reports or additional information may be added as supplementary material. Images will be fully printed; title and author(s) will be listed in bibliographical databases such as Medline.

Editorials

The JIMD invites communicating editors and reviewers of articles that have been accepted for publication in the JIMD to provide an editorial that places the article in a broader context. Editorials have no abstract, may be comprised of up to 500 words and should contain no more than two (if any) references. Additional material can be added as supplementary material online. Editorials will be fully printed; title and author(s) will be listed in bibliographical databases such as Medline.

Letters

The JIMD invites comments on previously published articles in the journal which should reach the editorial office within 4 weeks of publication of the original item. Correspondence may be subjected to peer-review and counter-replies are usually invited from the authors of the original publication. The concise form of a letter may also be used to report exceptionally important clinical or research information unrelated to a previous JIMD publication.

Letters should have no more than five authors. They have no abstract, are limited to a maximum of 500 words and should contain no more than two (if any) references. Additional material can be added as supplementary material online. Letters will be

fully printed; title and author(s) will be listed in bibliographical databases such as Medline.

Reports (Online Articles)

Some manuscripts present scientifically sound research findings or clinical observations that are worth communicating but are of more limited interest to the readers of JIMD and may be sufficiently summarised in an abstract of 250 words. In order to facilitate publication of these types of manuscripts, “**JIMD Reports**” has been introduced as a sister of the traditional “JIMD”. It is positioned as an independent periodical with its own ISSN number. All manuscripts submitted as Reports to the JIMD website will be considered for “JIMD Reports” rather than for the traditional journal. They will undergo the same review process as Original Articles (and in exceptional cases may be reassigned for publication in the traditional “JIMD”). In addition, the Editorial Team (based on the advice of reviewers and Communicating Editors) may reject Original Articles for publication in the traditional “JIMD” but offer publication in “JIMD Reports”. After acceptance, articles in “JIMD Reports” will be professionally typeset in the same manner as articles in “JIMD”. Reports will be available online and fully referenced in bibliographical databases. They will be submitted to relevant international abstracting and indexing services with an embargo of no more than 12 months and thus (in contrast to traditional “JIMD” articles) will be available free of charge after a certain time period. In addition, titles and abstracts of Reports are printed in the print-only “Extras” section of the traditional “JIMD”. It is recommended to use of the full allowance of 250 words for the abstract of Reports to convey the message of the article to the widest possible readership.

Reports follow the same rules as Full Articles; they should not be used as a form of preliminary communication. They may take the form of **Research Reports**, with content similar to that of original articles, or **Case Reports**. Case reports will only be considered when they highlight some unusual or previously unrecorded feature relevant to the disorder, or serve as an important reminder of clinical or biochemical features of a Mendelian disorder. Chance associations of two conditions or sporadic cases from new geographical locations (as opposed to systematic epidemiological studies) are not in themselves of sufficient scientific merit to justify publication.

Extras in the JIMD

The Editors of the JIMD invite submission of short items that are interesting, stimulating, important or entertaining to professionals working in the field of inborn errors of metabolism. These items will not usually be reviewed outside the editorial board and usually will not be referenced in bibliographic databases. All items of this type should be submitted by Email to the editorial office (editor@jimd.org); please provide full personal details for all authors of each contribution.

Observations and opinions

The JIMD wishes to provide a forum for relevant or stimulating opinions, ideas, experiences or personal views that merit communication without fulfilling the requirements for scientific articles or short reports. Items in this section may include anecdotal experiences that are deemed important to others in the field, unusual clinical observations, puzzling complications or novel side effects, or summaries of contributions e.g. to the metabolic Email list metab-l.

Observations should consist of one to two short paragraphs (maximum 500 words) and should contain no more than two (if any) references. No more than five authors may be included.

Fillers

Small texts that are used to fill gaps, e.g. at the end of original articles, have been a long and cherished tradition in some journals. They usually have the added advantage of entertaining readers and stimulating thought. The Editors invite interesting stories or personal experiences of up to a few hundred words on topics such as:

- A patient / paper / experience that changed my practice
- A memorable patient / experience
- An error that proved educational or informative for lab operation or clinical care
- How I embarked on this career path, and lessons learned along the way
- Any other story conveying instruction, pathos, or humour

If the filler refers to an identifiable person, written consent for publication from that person or an appropriate relative is required.

Book Reviews

Instructive reviews of up to 400 words are invited on new books published in the field of inborn errors of metabolism, or closely affiliated areas.

Obituaries

The Editors of the JIMD strongly encourage submission of obituary notices for all recently deceased SSIEM members or other persons in the field of inborn errors of metabolism. Obituary notices should be mailed to the editorial office. Please give your name and contact details, including a phone number and email address. Obituaries will be considered by the editorial board and may be shortened; they will be published (without proofs) with the name of the person(s) who submitted the notice.

Please provide:

1. The full **name** of the deceased
2. A (black and white) photograph
3. A summary of **important data**:

- a. *Professional position/title, place of work*
- b. *Date and place of birth*
- c. *Primary degree with university and year when obtained*
- d. *Additional professional qualifications with university and year when obtained*
- e. *Date of death, Cause of death*

4. The **main text** summarising important contributions and personal characteristics of the deceased. The last sentence should state the remaining relatives such as spouse and/or the number of children and grandchildren.

Instructions for submission

Material submitted to the JIMD (incl. JIMD Reports) must conform to the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals as outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/index.html>); see also International Committee of Medical Journal Editors (1999) *Med Educ* 33: 66-78.

Online Submission

All scientific contributions for publication in the JIMD (including JIMD Reports) must be submitted by the web-enabled online manuscript submission and review system. As the review process is also fully web-based, this system allows editors to keep review times as short as possible and offers authors the option to track progress of the review of their manuscripts. The online manuscript submission and review system for the Journal of Inherited Metabolic Disease offers easy and straightforward log-in and submission procedures. Please refer to:

www.editorialmanager.com/boli

The system supports a wide range of submission file formats for manuscripts (Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX) and figures (TIFF, EPS, Microsoft® Office formats and Postscript). PDF is not an acceptable file format.

If you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please contact the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

General rules

It is a condition of acceptance that all articles have not been and will not be published elsewhere in substantially the same form. The submitting author must have circulated the article and secured final approval of the version to be peer-reviewed from all co-authors prior to article submission. This includes confirmation of

- absence of previous similar or simultaneous publications,
- their inspection of the manuscript,

- their substantial contribution to the work (all authors should have been involved in (a) conception and design, or analysis and interpretation of data, and (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content)
- their agreement to submission.

It should be noted that these conditions are later confirmed in writing by the corresponding author in a copyright transfer form at the time of acceptance. Publication elsewhere, at any time, of a similar article perhaps only differing in some aspects of data, especially if the JIMD article is not cross-referenced, may justify formal retraction at a later date.

Supplementary (internet-only) material may be published for all articles; we encourage or request deposition of raw data when this appears appropriate.

The following information will be required at the time of online manuscript submission and may also be provided on the third manuscript page:

- *Details of the contributions of individual authors*, making clear who has contributed pertinent aspects of the planning, conduct, and reporting of the work described in the article.
- *Name of one author who serves as guarantor* for the article, accepts full responsibility for the work and/or the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.
- *A competing interest statement*, i.e., either a statement describing the interests of all authors or a declaration that they have nothing to declare, based on the “Competing Interests Questions” outlined below.
- *Details of funding* for all research studies including a statement that “The author(s) confirm(s) independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors”
- *Details of ethics approval* or a statement that it was not required for all research studies
- *A patient consent statement* for all articles or other material that contain personal information about a patient; proof that informed consent was obtained must be available upon request
- If vertebrate animals have been utilized, documentation of *approval from the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals* (or comparable committee).

Competing Interests

Conflict of interest exists when an author (or the author’s institution), reviewer, or editor has financial or personal relationships that inappropriately influence (bias) his or her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). These relationships vary from those with negligible potential to those with great potential to influence judgment, and not all relationships

represent true conflict of interest. The potential for conflict of interest can exist whether or not an individual believes that the relationship affects his or her scientific judgment. Financial relationships (such as employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony) are the most easily identifiable conflicts of interest and the most likely to undermine the credibility of the journal, the authors, and of science itself. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships, academic competition, and intellectual passion.

All authors (co-authors) of articles, reports, reviews, editorials and other material submitted to JIMD (including JIMD Reports) as well as reviewers of manuscripts must answer the following questions:

1. Have you in the past five years accepted the following from an organisation that may in any way gain or lose financially from the results of your study or the conclusions of your review, editorial, or letter:

- Reimbursement for attending a symposium?*
- A fee for speaking or for organising education?*
- Funds for research or for a member of staff?*
- A fee for consulting?*

2. Have you in the past five years been employed by an organisation that may in any way gain or lose financially from the results of your study or the conclusions of your review, editorial, or letter? Do you hold any stocks or shares in such an organisation?

3. Have you acted as an expert witness on the subject of your study, review, editorial, or letter?

4. Do you have any other competing financial interests?

Authors who have answered "yes" to any of these questions may have a competing interest which should be declared at the time of submission of the article (review, editorial or other material) and which will be published in JIMD.

Other non-financial interests that authors may like to disclose include:

- A close relationship with, or a strong antipathy to, a person whose interests may be affected by publication of the article.*
- An academic link or rivalry with somebody whose interests may be affected by publication of the article.*
- Membership of a political party or special interest group whose interests may be affected by publication of the article.*
- A deep personal or religious conviction that may have affected what you wrote and that readers should be aware of when reading the article.*

Expert reviewers approached for assessment of submitted articles are also requested to declare conflicts of interest that may impede on their judgement of that article. This specifically includes competing research in the same area that could be negatively affected by publication of the submitted article.

For additional information see also “uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” at www.icmje.org.

Manuscript structure

The first page should include:

- *Title* of the article
- *Authors' names and institutional affiliations* set out as in a current issue of the JIMD
- Name, email address and full postal address, including postal (ZIP) code, of the author who will be dealing with correspondence and proofs.
- *Word counts* for the text (excluding summary, acknowledgments, references and figure legends) and the summary. *Number of figures and tables*; please also state whether a colour picture is provided that may be used for the *front cover of the issue in which* the article appears.

The second page should include

- A *summary (= abstract)* of not more than 250 words (Medline allows a maximum of 4096 characters and will truncate longer abstracts).
- A *concise 1 sentence take-home message* (synopsis) of the article, outlining what the reader learns from the article (this is usually printed on the (inside) back cover of JIMD)

Units, symbols, database references

At the time of first mention, diseases, enzymes or genes should be referenced to the appropriate classification, nomenclature or database:

- Inherited diseases to the OMIM catalogue number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)
- Enzymes to an Enzyme Commission (EC) number (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)
- Genes to the HUGO-approved gene symbol (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>)

Authors should use SI units throughout the manuscript. Biochemical nomenclature should follow IUPAC-IUB recommendations (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn/>). Nomenclature of mutations or genetic variants should follow HGVS recommendations (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). At the time of first mention, genetic variants should be described with both protein designation and DNA designation (based preferably on cDNA reference numbers).

References to electronic databases (e.g. OMIM disorder/gene accession number(s), EC numbers, HUGO-approved gene symbol, GenBank Accession and version number(s) of the relevant wild-type gene sequence(s), locus-specific database(s) or other URLs of relevant databases)

Previously published material should be acknowledged, and written permission from copyright holders must be obtained to reproduce figures, tables or substantial sections of text. Where a paper relies on material that is under consideration by, or in press in another journal, a copy of this must be provided for the referees.

When writing the articles, please keep in mind the broad readership of the JIMD. For example, for methods that are widely reported or published it may be worthwhile to provide a brief two to three sentence description of the protocol to provide the reader with some insight into the methods used.

References

Consult a current issue of the journal. Citations in the text should use authors' names then the date, e.g.: (Smith and Smith 1977); for 3 or more authors use et al, e.g. (Jones et al 1989).

The full references are listed in alphabetical order at the end of the paper. Authors are listed without 'and'. Give the first 3 authors plus et al when there are 7 or more authors. Both in the text and list use 'et al' without punctuation or italicization. Journal abbreviations follow Index Medicus or Chemical Abstracts. Examples are:

Journals:

Smith AL, Smith JD (1977) Hybridisation methods. *Nucl Acids Res* 8: 1095–1098.

Chapter in an edited book:

Weinstein L, Swartz MN (1974) Pathologic mechanisms of invading microorganisms. In Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathogenic Physiology: Mechanisms of Disease*. Philadelphia: WB Saunders, 457–472.

To cite a web site in the text (but not a specific document), it is sufficient to give the address/URL (e.g., <http://www.ssiem.org>) without an entry in the reference list. However, when citing a specific web document or information, a standard citation in the text (e.g. Gaten 2000) and an entry in the reference list is required. Internet references should include the same information that would be provided for a printed source (or as much information as possible). The Web information is then placed at the end of the reference. It is important to use "Retrieved from" and the date because documents on the Web may change in content, move, or be removed from a site altogether.

Reference to personal communications requires the explicit approval of the person quoted; written confirmation must be provided. Authors - not journal editors or copy editors – are responsible for the accuracy of all references, which includes verifying the source of email communications, before citing them as personal communications in manuscripts.

Research materials

It is assumed that authors whose research is published by the JIMD will make antibodies, cloned DNA sequences, and similar materials available to other investigators in noncommercial institutions, so as to permit replication of the reported work.

After acceptance of a manuscript

Proofs will be sent to the corresponding author by email. Responses, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not correct or edit the PDF file. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas). Minor corrections (+/- 10) may be sent via email attachment to proofscorrection@springer.com. Always quote the four-letter journal code (BOLI) and article number from your proof in the subject field of your Email.

No **page charges** are levied on authors or their institutions except for colour pages. The corresponding author will be contacted regarding costs and invoicing if the printed manuscript includes colour figures. Colour page charges may be waived at the discretion of the editors.

Authors will be asked to transfer **copyright** of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. See also: www.springeronline.com/openchoice **Neuroche**