

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

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA QUITOTRIOSIDASE DE INDIVÍDUOS  
NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER  
COM E SEM TRATAMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso

Cristina da Silva Garcia

Porto Alegre, Dezembro de 2012.

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

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA QUITOTRIOSIDASE DE INDIVÍDUOS  
NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER  
COM E SEM TRATAMENTO

Cristina da Silva Garcia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janice Carneiro Coelho

Porto Alegre, Dezembro de 2012.

Este trabalho foi realizado seguindo as normas da Revista Clinical Biochemistry que estão anexadas no apêndice C.

INSS: 0009-9120

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA QUITOTRIOSIDASE DE  
INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA DE GAUCHER  
COM E SEM TRATAMENTO**

Cristina da Silva Garcia<sup>1</sup>, Alessandro Wajner<sup>1</sup>, Janice Carneiro Coelho<sup>1\*</sup>

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

\* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. 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: +55 51 33085550

Fax: +55 51 33085535

E-mail: janice.coelho@ufrgs.br

# Sumário

Sumário.....	5
Resumo .....	6
Palavras Chaves .....	6
1. Introdução .....	7
2. Material e Métodos .....	8
2.1. Amostras .....	8
2.2. Ensaio enzimático.....	8
2.3. Análise estatística .....	9
3. Resultados.....	10
3.1. Atividade enzimática da Quitotriosidase.....	10
3.2. Determinação do pH ótimo.....	10
3.3. Determinação do Km e V <sub>máx</sub> .....	10
3.4. Determinação da estabilidade térmica.....	11
4. Discussão .....	12
5. Referências .....	15
Apêndice A: Figuras .....	16
A.1. Figura 1 .....	16
A.2. Figura 2.....	17
A.3. Figura 3.....	18
A.4. Figura 4.....	19
A.5. Figura 5.....	20
Apêndice B: Legendas.....	21
Apêndice C: Normas da revista Clinical Biochemistry.....	22

## Resumo

A quitotriosidase (QT) encontra-se com sua atividade elevada em algumas doenças lisossômicas de depósito. Sendo assim, esta enzima pode ser utilizada como marcador no diagnóstico bioquímico. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e comparar os parâmetros bioquímicos ( $K_m$ ,  $V_{máx}$ , pH ótimo e estabilidade térmica) da QT em indivíduos com Doença de Gaucher (G) antes e depois (TG) de instituído o tratamento por reposição enzimática de modo a observarmos se ocorre uma mudança em seu comportamento. A atividade da QT foi medida em plasma utilizando-se o substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'-N''-triacetilquitotriosideo. Para determinação do pH ótimo variamos o pH da reação entre 3,5 a 6,8. O  $K_m$  e a  $V_{máx}$  foram determinados com concentrações de substrato 0,005 a 0,02mM para indivíduos normais (C), pacientes G e TG. Para os estudos de estabilidade térmica, as amostras foram pré-incubadas durante 1, 3, 5, 10 e 15 min a 50° C e 1, 3 e 5min a 60° C, na ausência de substrato. A reação enzimática foi então incubada a 37°C. Conseguimos diferenciar o grupo C do G de acordo com o  $K_m$ ,  $V_{máx}$  e estabilidade térmica a 50 e 60°C, diferenciamos o grupo C do TG de acordo com o  $K_m$  e estabilidade térmica a 60°C e diferenciamos o grupo G do TG de acordo com a  $V_{máx}$  da reação. Sendo assim, a não ser através da medida da  $V_{máx}$  da reação enzimática, não foi possível distinguir indivíduos com e sem tratamento ou mesmo observar a eficiência deste através de medidas de parâmetros bioquímicos desta enzima.

**Palavras Chaves:** Quitotriosidase, Doença de Gaucher, Doenças Lisossômicas de Depósito, Cinética Enzimática.

# 1. Introdução

A Quitotriosidase (QT) é uma quitinase, pertencente a família das glicosilhidrolases, secretada por macrófagos ativados de nosso organismo. Em condições fisiopatológicas esses macrófagos ativados podem produzir grandes quantidades dessa enzima[1].

Já é sabido que a quitotriosidase encontra-se com sua atividade muito elevada em algumas doenças lisossômicas de depósito (DLD) como a doença de Gaucher, doença de Niemann-Pick tipo A, B e C, Doença de Krabbe e gangliosidose GM1[2], [3]. Sendo assim, esta enzima pode ser utilizada como marcador no diagnóstico bioquímico destas DLDs.

A Doença de Gaucher (DG) é a doença lisossômica de depósito mais comum. É uma esfingolipidose causada pela deficiência da enzima  $\beta$ -glicosidase (GBA) gerando acúmulo de glicosilceramidas no interior das células. A incidência da DG é de 1:57000 nascimentos na população em geral mas pode chegar a 1:900 na população Ashkenazi Jewish [4].

O aumento na atividade da QT na Doença de Gaucher chega a ser de mais de 1000 vezes [3]. Com isto, a medida da atividade da QT pode auxiliar também no acompanhamento da eficácia do tratamento para DG. A relação entre o aumento da atividade da enzima QT e a DG ainda é desconhecida, contudo observou-se que com o tratamento da DG por reposição enzimática (TRE) há um decréscimo na atividade da QT. Este decréscimo, até o momento, é o melhor e mais usado parâmetro para avaliação da eficácia do tratamento com TRE [2], [4].

Embora se saiba que a atividade da QT diminui conforme o tratamento é instituído, ela não volta ao normal, ficando, assim, significativamente mais alta que a atividade de indivíduos saudáveis. Além disso, não se sabe o que ocorre com a QT em relação aos seus parâmetros cinéticos e bioquímicos depois de instituída a TRE.

Já observamos, em trabalhos anteriores [3], [5], que a QT de indivíduos com Doença de Gaucher comporta-se de maneira diferente daquela de indivíduos normais, quanto ao pH ótimo, Km e velocidade máxima da reação enzimática na presença do substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'N''-triacetilquitotriosideo. Também foi observado um comportamento diferente da enzima de pacientes, quanto à sua inativação em temperatura mais alta (60°C) que aquela da reação enzimática (37°C). O mesmo

ainda não foi estudado quanto à enzima de indivíduos com Doença de Gaucher em tratamento por reposição enzimática.

Levando-se isto em consideração, o objetivo deste trabalho foi estabelecer e comparar os parâmetros bioquímicos da QT em indivíduos com DG antes e depois de instituído o tratamento por reposição enzimática de modo a observarmos se ocorre uma mudança em seu comportamento.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Amostras**

Os plasmas foram obtidos de amostras de sangue periférico coletados em tubos de coleta heparinizados e centrifugados por 10 minutos a 2000rpm. Após a separação, o plasma foi armazenado a -20°C até a análise enzimática. As amostras foram obtidas de voluntários saudáveis e pacientes com doença de Gaucher com e sem tratamento, com n=5 para cada grupo. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de Ética de nossa Universidade de acordo com a World Medical Declaration de Helsinki para princípios éticos em estudos de pesquisa clínica envolvendo seres humanos. Os participantes assinaram o termo de consentimento informado antes de iniciarem o estudo.

### **2.2. Ensaio enzimático**

A atividade da enzima quitotriosidase foi medida em plasma, de acordo com a técnica de Hollak *et al* (1994) [1], usando o substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'N'-triacetilquitotriosideo. A amostra do ensaio enzimático continha 5  $\mu$ L de plasma acidificado e 100  $\mu$ L do substrato (0,026 mM) dissolvido em tampão citrato-fosfato pH 5,2, num volume total de 105  $\mu$ L. Esta mistura foi incubada durante 15 min a 37°C. A reação foi interrompida com 1 mL de tampão glicina-hidróxido sódio pH 10,3. Após a incubação uma alíquota de 200  $\mu$ L foi transferida para uma placa preta de 96 poços (Perkin-Elmer, 96F) e a fluorescência foi lida com espectrofluorímetro SpectraMax M5, Molecular Devices (comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 e 450nm, respectivamente).



Para determinação do pH ótimo utilizou-se do tampão citrato-fosfato 0,54 M com pH variando de 3,5 a 6,8.

Para determinação da Curva de Michaelis-Mentem (curva de substrato), utilizou-se as concentrações finais de substrato de 0,001 mM a 0,1 mM de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'N''-triacetilquitotriosídeo. Determinando inicialmente a porção linear da curva, onde a atividade enzimática é proporcional a concentração do substrato.

O Km e a velocidade máxima (Vmax) foram determinados com concentrações de substrato 0,005 mM a 0,02 mM para indivíduos normais (C), pacientes DG (G) e pacientes DG em tratamento (TG). Os parâmetros foram calculados utilizando o gráfico de Lineweaver e Burk com um coeficiente de correlação de  $r = 0,99$  para todas as curvas.

Para os estudos de estabilidade térmica da enzima, as amostras foram pré-incubadas durante 1, 3, 5, 10 e 15 min a 50° C e 1, 3 e 5min a 60° C, na ausência de substrato. A reação enzimática foi então processada a 37° C durante 15 minutos com 0,026 mM de substrato.

O substrato artificial 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-NN'N''-triacetilquitotriosídeo foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) e os demais reagentes foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

### ***2.3. Análise estatística***

Para comparação dos grupos foi realizada uma ANOVA de uma via, seguida de pós teste de Tukey, quando necessário, os dados são apresentados com média  $\pm$  DP. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5 e o nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1. Atividade enzimática da Quitotriosidase

Observamos que a atividade da enzima quitotriosidase no plasma de pacientes DG (G) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que em indivíduos normais (C) e pacientes DG em tratamento (TG) ( $C = 10,38 \pm 7,46$  nmol/h/mL;  $G = 3281,24 \pm 988,79$  nmol/h/mL;  $TG = 1024,40 \pm 979,32$  nmol/h/mL, respectivamente). Os valores das atividades enzimáticas da QT em todos os grupos demonstraram-se de acordo com os valores de referência ( $C = 1,74 - 175,84$  nmol/h/ml;  $G = 180,30 - 53991$  nmol/h/ml;  $TG = 890,04 - 5038,78$  nmol/h/ml). Observamos também que o grupo TG possui atividade da QT significativamente maior que aquela do grupo C ( $P < 0,05$ ).

### 3.2. Determinação do pH ótimo

Fig.1 mostra o pH ótimo para atividade da QT do grupo C, G e TG. O pH ótimo para atividade da QT para o grupo C foi  $5,00 \pm 0,31$ , para o G foi  $4,8 \pm 0,23$  e para o TG foi  $5 \pm 0,12$ . Não observamos diferença significativa entre os grupos.

### 3.3. Determinação do $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$

A média do  $K_m$  da atividade da QT no grupo C foi  $4,94 \pm 2,04$   $\mu\text{M}$ , no grupo G foi  $23,02 \pm 0,67$   $\mu\text{M}$  enquanto para o grupo TG foi  $18,64 \pm 3,14$   $\mu\text{M}$ . O  $K_m$  no grupo G não difere significativamente daquele do grupo TG, porém ambos diferem significativamente do grupo C ( $P < 0,0001$ ), como visto na Fig. 2.

Observamos que a média da  $V_{m\acute{a}x}$  do grupo C foi  $63,07 \pm 17,07$  nmol/h/mL, no grupo G foi  $10633,66 \pm 3372,46$  nmol/h/mL e no grupo TG foi  $657,66 \pm 402,61$  nmol/h/mL. A  $V_{m\acute{a}x}$  do grupo C não difere significativamente da  $V_{m\acute{a}x}$  do grupo TG, porém difere do grupo G ( $P < 0,001$ ) e estes por sua vez diferem do grupo TG ( $P < 0,001$ ), como visto na Fig. 3.

### **3.4. Determinação da estabilidade térmica**

Para o estudo da estabilidade térmica foi determinada a atividade residual da enzima QT pré-incubada a 50°C por 1, 3, 5 10 e 15 min e a 60°C por 1, 3 e 5 min. A atividade enzimática é relatada como porcentagem de atividade residual comparado a amostras não submetidas à pré-incubação (100% de atividade). A Fig. 4 compara a atividade residual da QT dos grupos C, G e TG pré-incubados a 60°C e a Fig. 5 compara a atividade residual da QT dos grupos C, G e TG pré-incubados a 50°C.

Na pré-incubação a 60°C ocorreu inativação térmica da enzima em todos os grupos examinados ( $P < 0,0001$ ). A 1 min de pré-incubação, observamos que o grupo C é mais estável que os demais ( $P < 0,01$ ). Aos 3 min os grupos praticamente são inativados da mesma maneira, mas aos 5 min observamos que a atividade residual da enzima no grupo C, é muito menor que aquela dos demais grupos ( $P < 0,01$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos G e TG em nenhum dos tempos analisados.

Aos 50°C, observamos que a enzima de todos os grupos analisados aumenta significativamente sua atividade, diminuindo logo a seguir. No grupo C a enzima é ativada a 1 e 3 min de pré-incubação diminuindo sua atividade a partir de 5 min ( $P < 0,01$ ). Nos grupos G e TG a ativação enzimática persiste até 10 min caindo significativamente aos 15 min de pré-incubação ( $P < 0,009$ ). Embora o comportamento acima difira entre o grupo C e os demais grupos, todos se comportam de maneira semelhante dentro de cada tempo analisado, com exceção do grupo G que difere significativamente do grupo C aos 10 min de pré-incubação ( $P < 0,009$ ).

## 4. Discussão

A Quitotriosidase (QT) hidrolisa substratos quitotriosídeos de forma semelhante as quitinases que são encontradas numa variedade de espécies [3]. Macrófagos humanos ativados em cultura, derivados de monócitos do sangue periférico, têm demonstrado um aumento na atividade da QT [2]. Por outro lado, atividades aumentadas da QT foram demonstradas na DG, a DLD mais comum, bem como na doença de Niemann-Pick, mas em menor grau [1], [6]. Além disso, uma relação proporcional tem sido demonstrada entre a gravidade da DG e os níveis de QT [6]. Também tem sido demonstrado que os níveis de QT diminuem durante o tratamento de pacientes com DG por reposição da enzima deficiente ou transplante de medula óssea [5]. Assim, apesar de muito pouco se saber sobre as propriedades bioquímicas da QT em seres humanos, incluindo a sua ação específica, a sua atividade tem sido utilizada como um marcador bioquímico para o diagnóstico e monitoramento da terapia de reposição enzimática na DG. No presente estudo, avaliou-se vários parâmetros bioquímicos da presente enzima, tais como pH ótimo, Km, V<sub>máx</sub> e estabilidade térmica no plasma de indivíduos normais, pacientes com DG e pacientes com DG em tratamento. Nosso objetivo foi estabelecer e comparar os parâmetros bioquímicos da QT em indivíduos com DG antes e depois de instituído o tratamento por reposição enzimática de modo a observar se ocorre uma mudança em seu comportamento.

Observou-se que a atividade plasmática da QT era muito mais elevada em pacientes com DG e em pacientes DG em tratamento, em comparação a indivíduos normais, fato que está de acordo com estudos anteriores [1], [2], [6], [7]. Encontramos também uma alta variabilidade da atividade da QT no plasma de indivíduos normais, bem como nos grupos G e TG. Variabilidade semelhante foi encontrada por outros investigadores e é possivelmente influenciada por diversos fatores, como idade, massa corporal e genótipo da QT [1], [2], [8].

Verificamos que o pH ótimo não foi significativamente diferente entre os três grupos examinados. Através deste parâmetro, então, não conseguimos separar os grupos C, G e TG. Os dados encontrados não diferem de outros trabalhos anteriores [2], [7].

O Km da enzima QT foi significativamente mais baixo no grupo C, em relação aos outros dois grupos de pacientes e está de acordo com aquele já estabelecido em trabalhos anteriores [2], [7]. Isto sugere uma maior afinidade da QT, em indivíduos normais, pelo substrato utilizado. Tanto o grupo G quanto o grupo TG apresentaram um

Km semelhante. Isto demonstra que mesmo com uma velocidade máxima diferente, ou seja, maior no grupo G do que no grupo TG, a afinidade pelo substrato não se altera. O Km demonstrado para o grupo G também está de acordo com aqueles de trabalhos anteriores [2], [7].

Mesmo com grande variabilidade na atividade enzimática, os dois grupos: G e TG comportaram-se de maneira diferente quanto à velocidade máxima da reação. Isto já era esperado, uma vez que quando instituído o tratamento, a velocidade da reação enzimática diminuiu consideravelmente. Para nossa surpresa, a velocidade máxima da reação em indivíduos normais não diferiu significativamente daquela de indivíduos TG. Mais uma vez, a variabilidade entre a atividade enzimática dos indivíduos pode ter interferido. A velocidade máxima da reação para indivíduos normais e aqueles com DG já havia sido demonstrada anteriormente e é semelhante a demonstrada neste estudo atual [2].

No que diz respeito à estabilidade térmica, verificou-se que a atividade da QT foi significativamente reduzida em todos os grupos por incubação do plasma em 60°C após 5 min. Na pré-incubação a 60°C ocorreu uma diferença significativa entre o grupo C e os grupos G e TG. A diferença entre o grupo C e o grupo G já havia sido demonstrada por outros investigadores [3]. No entanto, a diferença entre indivíduos normais e aqueles em tratamento por reposição enzimática através da pré-incubação da QT à 60°C, foi demonstrada pela primeira vez no trabalho atual. Segundo Wajner et al [2], essa medida representa um parâmetro em potencial a ser utilizado para diferenciar indivíduos normais de pacientes com DG.

Na pré-incubação do plasma a 50°C observamos um aumento da atividade da QT no grupo C até 3 min e nos grupos G e TG até 10 min. Após estes períodos a atividade da QT cai significativamente, mas é impossível distinguir-se os 3 grupos em estudo, com exceção aos 10 min em que o grupo C difere do grupo G, pois a inativação é praticamente a mesma.

A inativação ou ativação térmica, tanto à 60°C quanto à 50°C, respectivamente, em determinados tempos de pré-incubação, pode representar um parâmetro para diferenciar o grupo C dos grupos G e TG, no entanto esta medida não representa um parâmetro para distinguirmos os grupos de pacientes com DG com e sem tratamento.

Os resultados aqui obtidos nos permitem observar que a enzima de indivíduos normais comporta-se de maneira diferente daquela de indivíduos com doença de Gaucher, como já havíamos observado em trabalhos anteriores [2], mas, no momento

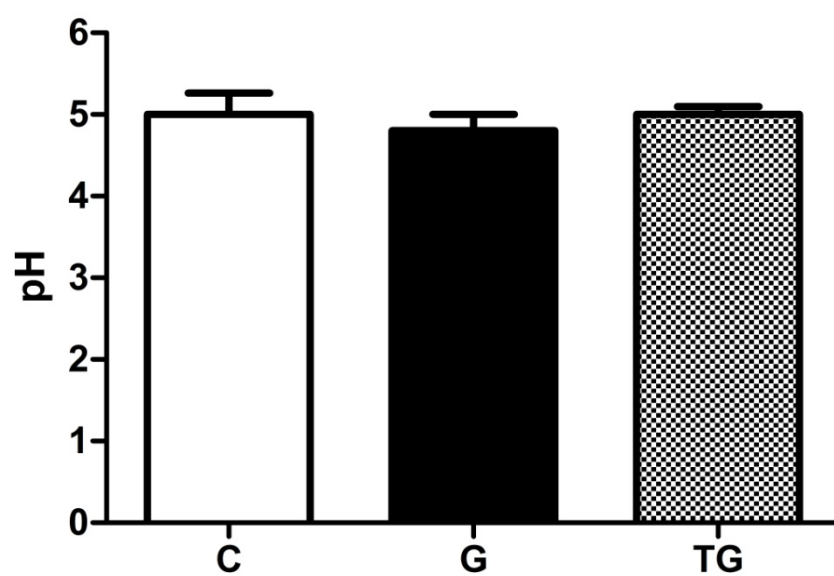
em que é instituído o tratamento, embora a atividade enzimática diminua e isto possa ser um indicativo de eficiência do mesmo, as propriedades cinéticas não voltam ao normal, salvo a velocidade máxima da reação. Sendo assim, não ser através da medida da velocidade máxima da reação enzimática, não é possível distinguir indivíduos com e sem tratamento ou mesmo observar a eficiência do tratamento através de medidas de parâmetros bioquímicos desta enzima. Estudos posteriores, com diferentes tempos de tratamento por reposição enzimática, são necessários para verificarmos se ocorre uma diferença significativa na velocidade máxima da reação da QT após diferentes tempos de instituição da TRE, de modo a estabelecermos parâmetros de controle da eficácia da terapia.

## 5. Referências

- [1] A. M. Centre, C. E. M. Hollak, van W. S, van O. M. H. J, and A. JMFG, “Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity,” *A Novel Hallmark of Gaucher Disease*, vol. 93, no. March, pp. 1288–1292, 1994.
- [2] A. Wajner, K. Michelin, M. G. Burin, R. F. Pires, M. L. S. Pereira, R. Giugliani, and J. C. Coelho, “Biochemical characterization of chitotriosidase enzyme: comparison between normal individuals and patients with Gaucher and with Niemann-Pick diseases.,” *Clinical biochemistry*, vol. 37, no. 10, pp. 893–7, Oct. 2004.
- [3] M. Masoud, B. Rudensky, D. Elstein, and a. Zimran, “Chitotriosidase Deficiency in Survivors of Candida Sepsis,” *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 29, no. 1, pp. 116–118, Jul. 2002.
- [4] Y. Guo, W. He, A. M. Boer, R. A. Wevers, A. M. de Bruijn, J. E. Groener, C. E. Hollak, J. M. Aerts, H. Galjaard, and O. P. van Diggelen, “Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders.,” *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 18, no. 6, pp. 717–22, Jan. 1995.
- [5] E. Young, C. Chatterton, A. Vellodi, and B. Winchester, “Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase.,” *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 20, no. 4, pp. 595–602, Aug. 1997.
- [6] Y. Guo, W. He, a M. Boer, R. a Wevers, a M. de Bruijn, J. E. Groener, C. E. Hollak, J. M. Aerts, H. Galjaard, and O. P. van Diggelen, “Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders.,” *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 18, no. 6, pp. 717–22, Jan. 1995.
- [7] A. Wajner, K. Michelin, M. G. Burin, R. F. Pires, M. L. S. Pereira, R. Giugliani, and J. C. Coelho, “Comparison between the biochemical properties of plasma chitotriosidase from normal individuals and from patients with Gaucher disease, GM1-gangliosidosis, Krabbe disease and heterozygotes for Gaucher disease.,” *Clinical biochemistry*, vol. 40, no. 5–6, pp. 365–9, Mar. 2007.
- [8] L. Bouzas, J. C. Guinarte, J. C. Tutor, and S. De Compostela, “Chitotriosidase Activity in Plasma and Mononuclear and Polymorphonuclear Leukocyte Populations,” vol. 275, no. May, pp. 271–275, 2003.

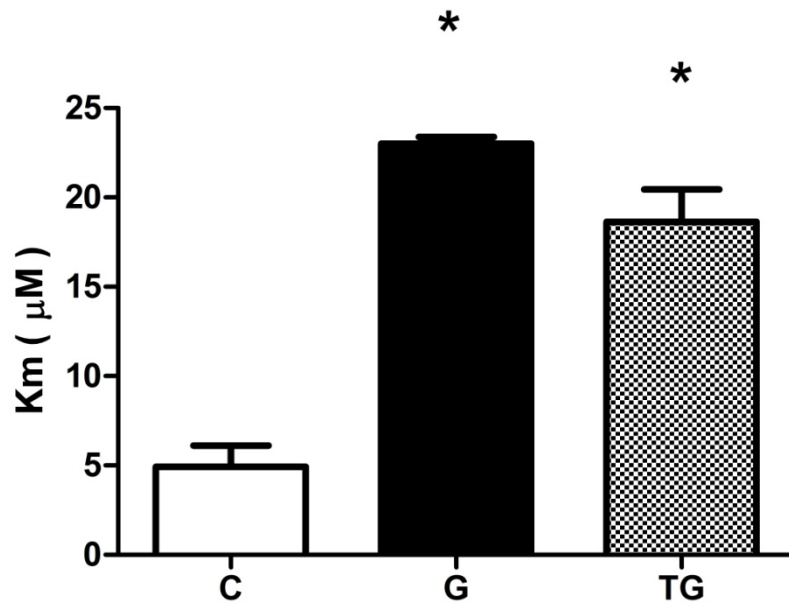
## Apêndice A: Figuras

### A.1. Figura 1

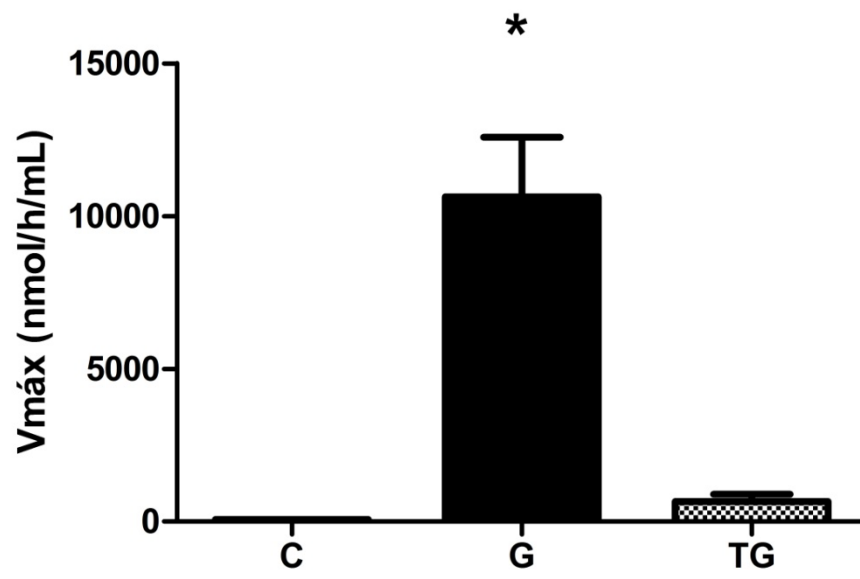




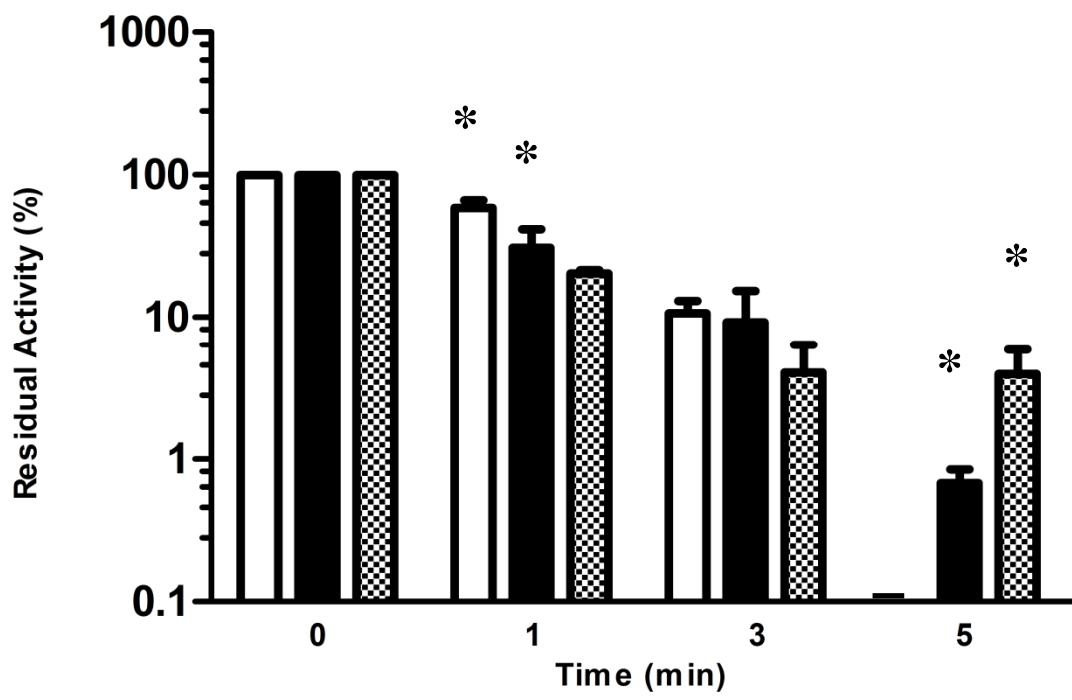
*A.2. Figura 2*



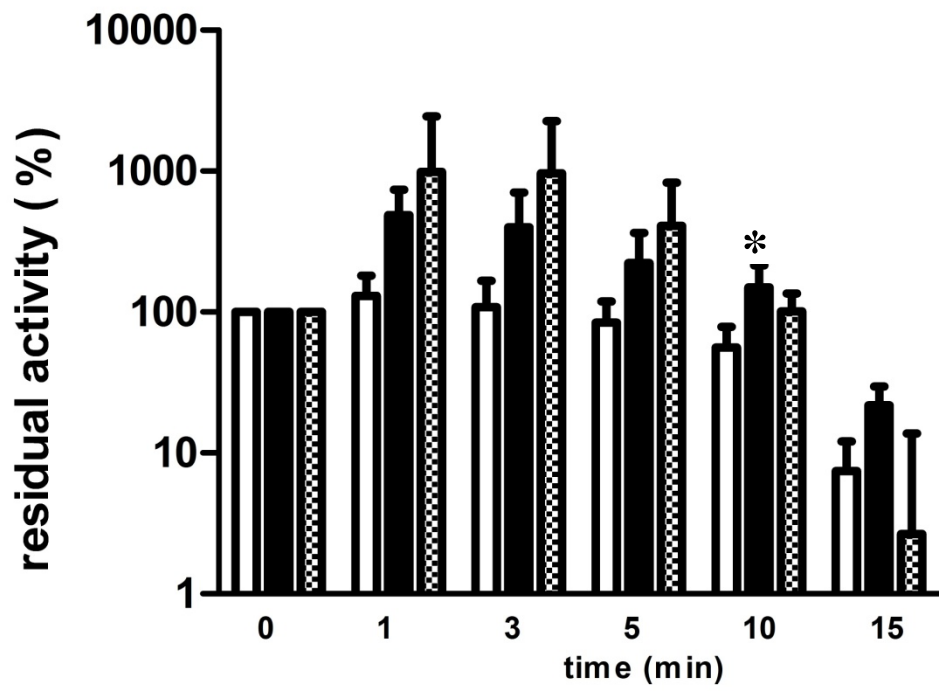
**A.3. Figura 3**



A.4. Figura 4



A.5. Figura 5



## Apêndice B: Legendas

Fig. 1. pH ótimo da enzima QT no plasma de indivíduos normais (C), pacientes Gaucher (G) e pacientes Gaucher em tratamento (TG). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Fig. 2. Constante de Michaelis ( $K_m$ ) da enzima QT no plasma de indivíduos normais (C), pacientes DG (G) e de pacientes DG em tratamento (TG). Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP ( $\mu$ M). \*Diferente significativamente do grupo C ( $P < 0,0001$ )

Fig. 3. Velocidade Máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da enzima QT no plasma de indivíduos normais (C), pacientes DG (G) e de pacientes DG em tratamento (TG). Os dados estão expressos como média  $\pm$  DP (nmol/h/mL). \*Diferente significativamente dos grupos C e TG ( $P < 0,0001$ )

Fig. 4. Estabilidade térmica da enzima QT após pré-incubação a 60°C do plasma de indivíduos normais (C= □), pacientes DG (G= ●) e pacientes DG em tratamento (TG=■). A atividade enzimática é relatada como porcentagem de atividade residual comparado a amostras não submetidas à pré-incubação (log de atividade). \*Diferente significativamente do grupo C no mesmo tempo de pré-incubação ( $P < 0,01$ )

Fig. 5. A estabilidade térmica da enzima QT pré-incubadas a 50°C no plasma de indivíduos normais (C= □), pacientes DG (G=●) e pacientes DG em tratamento (TG=■). A atividade enzimática é relatada como porcentagem de atividade residual comparado a amostras não submetidas à pré-incubação (log de atividade). \*Diferente significativamente do grupo C no mesmo tempo de pré-incubação ( $P < 0,009$ )

## Apêndice C: Normas da revista Clinical Biochemistry

### Preparacion

#### Use of wordprocessing software

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

#### *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 phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

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 250 words. The following headings should be included followed by a colon: a) Objectives: b) Design and Methods: c) Results: d) Conclusions.

## Maximum length of submissions

Full length articles should not exceed 4000 words (maximum 40 references), and up to 6 tables and/or figures with short communications comprising up to 1500 words of text, maximum 15 references, and two illustrative items (Tables and/or Figures). Letters will be classified as Case Reports (provide novel insight into disease mechanisms or diagnostic applications), Laboratory Notes (technical evaluation or important insight into analytical methodology), or Letters to the Editor (focused on a specific article that has appeared in *Clinical Biochemistry* within 4 weeks of print issue date of article). For all 3 types of letters listed above, the text should not exceed 500 words, with no abstract, a maximum of 1 table or figure and up to 5 references. Review Articles and Special Reports may exceed the word and reference limit for Full length articles as per the comprehensive nature of these articles. However, both of these articles (Reviews and Special Reports) will still require an abstract (unstructured, 250 word maximum). Editorials and Opinion pieces will not require an abstract and will be limited to 2000 words and up to 20 references.

## Graphical abstract

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

## Highlights

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

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 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.).

### Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

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

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, 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 (2010) 51–59.

Reference to a book:

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

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, 2009, 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/content/references/corejournals>.

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

#### *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 has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

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

For any further information please visit our customer support site

At <http://support.elsevier.com>.