



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM
ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

ELLEN PRISCILA DOS REIS FERREIRA

DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA A ATIVIDADE DA
ENZIMA BIOTINIDASE NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL E VALIDAÇÃO DE
PROTOCOLOS.

BELÉM-PA
2018

ELLEN PRISCILA DOS REIS FERREIRA

DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA A ATIVIDADE DA
ENZIMA BIOTINIDASE NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL E VALIDAÇÃO DE
PROTOCOLOS.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação Mestrado em
Análises Clínicas Profissional da
Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana Da Silva.

BELÉM-PARÁ
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F383d Ferreira, Ellen Priscila dos Reis
Determinação dos valores de referência para a atividade da enzima biotinidase no estado do Pará, Brasil e validação de protocolos / Ellen Priscila dos Reis Ferreira, Luiz Carlos Santana Da Silva. — 2018
26 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas (MACPRO), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
1. Biotinidase, Deficiência de biotinidase, Recém-nascido, Adulto, Temperatura. I. Da Silva, Luiz Carlos Santana. II. da Silva, Luiz Carlos Santana , *orient.* III. Título

CDD 572.7

SUMÁRIO

ARTIGO	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	3
RESULTADOS	5
DISCUSSÃO	6
CONCLUSÃO	8
REFERÊNCIAS	9
ANEXO 1- Normas da Revista	
ANEXO 2- Comitê de Ética	

Área do conhecimento: Saúde Pública e epidemiologia

Determinação dos valores de referência para a atividade da enzima biotinidase no estado do Pará, Brasil e validação de protocolos.

Ellen Priscila dos Reis Ferreira.

Universidade Federal Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Belém, Pará, Brasil - https://orcid.org/0000-0002-8015-8697-ellen_prf@hotmail.com.

Luiz Carlos Santana da Silva.

Universidade Federal Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Belém, Pará, Brasil - <https://orcid.org/0000-0003-1017-6221-lcsantana-pa@hotmail.com>.

RESUMO

OBJETIVO: Estabelecer valores de referência para atividade da enzima biotinidase em adultos, RN a termo e prematuros no estado do Pará em amostras de plasma e sangue impregnado em papel-filtro (SIPF) e definir protocolos de validação de temperatura para conservação de plasma. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram analisados dois grupos, grupo A com 278 amostras de plasma (RN a termo, prematuros e adultos) e grupo B com 121 de SIPF (RN a termo e adultos), quanto aos valores de referência para a atividade da enzima e se investigou tempo de conservação do plasma na geladeira (8°C) e no freezer (20°C). **RESULTADOS:** No grupo A apresentou média e desvio para adultos, RN a termo e prematuros de $7,0 \pm 1,9$; $4,4 \pm 0,7$; $3,2 \pm 0,4$ nmol de pABA/min/mL. Os valores para SIPF de adultos e RN a termo foram de $2,2 \pm 0,7$ e $1,3 \pm 0,2$. As alíquotas da geladeira se desestabilizaram no primeiro mês, enquanto, as do freezer a partir do quarto mês. Estatisticamente os grupos de recém-nascidos diferem dos adultos $p < 0,01$. **CONCLUSÃO:** Conclui-se que para a análise da atividade da biotinidase, é necessário avaliar se o paciente é RN a termo ou prematuro, pois esses grupos tem atividade reduzida se comparada a de um adulto, além de considerar quadros que afetem o a função hepática com a icterícia neonatal.

Palavras-chaves: Biotinidase, Deficiência de biotinidase, Recém-nascido, Adulto, Temperatura.

Endereço de Correspondência:

Ellen Priscila dos Reis Ferreira

TV. Vitória Régia, 505. Bairro: Apeú – CEP: 68740-432 – Castanhal, Pará, Brasil – Tel.: +55 (91) 3721-1777

E-mail: ellen_prf@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A biotinidase é uma glicoproteína monomérica com uma massa molecular de 76-77 kda e tem pelo menos nove isoformas¹. A produção da biotinidase foi verificada por *Northern blot*, sendo detectada a presença de seu mRNA em diversos órgãos humanos como coração, placenta, fígado, pulmão, músculo esquelético, rins e pâncreas². O gene da biotinidase está presente no cromossomo 3, na região 3p25 e contém quatro éxons e três íntrons. A biotinidase está envolvida na homeostase da biotina, atuando na utilização e reutilização desta vitamina^{3,4}.

A biotina é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B, conhecida como vitamina B7 ou H⁵. Ela serve como coenzima, ligando-se covalentemente, a quatro carboxilases: acetil-coenzima A (CoA) carboxilase, propionil-CoA carboxilase, β -metilcrotonil-CoA carboxilase e piruvato carboxilase, as quais estão envolvidas em várias funções metabólicas como a síntese de ácidos graxos, gliconeogênese e degradação de aminoácidos de cadeia ramificada⁶. As carboxilases depois de realizarem suas atividades são degradadas proteoliticamente, liberando biocitina (biotinil-lisina). A biocitina é clivada pela ação da Biotinidase, liberando a biotina em sua forma livre⁴.

A deficiência de biotinidase (DB), também chamada de deficiência múltipla de carboxilases de início tardio, é considerada um erro inato do metabolismo, pertencente ao grupo das acidemias orgânicas, que tem um padrão de herança autossômico recessivo. A DB pode ser classificada, de acordo com a atividade enzimática residual, em DB total, quando a atividade da biotinidase do paciente for menor que 10% da atividade da enzima normal, considerando um indivíduo que não tenha a doença. A DB pode ser também parcial, na qual o paciente tem entre 10-30% da média da atividade normal^{4,7}.

Os sinais e sintomas da deficiência de biotinidase estão relacionados à diminuição da biotina no organismo e incluem as dermatites, conjuntivites, alopecia, ataxia, hipotonia, convulsões, predisposição a infecções fúngicas, atraso no desenvolvimento mental, perda auditiva e atrofia ótica, acidemia láctica, hiperamoninemia, cetoacidose e acidúria orgânica⁸.

O tratamento dos indivíduos com DB total é feito com suplementação oral de biotina livre, com uma dose bem maior que a ingesta normal, sendo por toda vida. Essa dose varia entre 5-20 mg/dia⁹, porém o Ministério da Saúde sugere uma dose diária de 10-20 mg¹⁰.

Em relação à frequência das DB parcial e total não se observa muita diferença em populações distintas, sendo a incidência combinada (parcial e total) de 1: 60.089 nascidos vivos (NV)¹¹. No Brasil, a incidência da DB combinada é uma das mais altas, ficando entre 1: 6.843; 1: 9.000 e 1: 62.500 NV^{12,13,14}.

Na triagem neonatal, a DB pode ser confirmada através de testes colorimétricos qualitativos e quantitativos que determinam a atividade da enzima biotinidase, os quais utilizam amostras de sague impregnado em papel-filtro (SIPF) para o teste qualitativo e plasma para o quantitativo. Quando o primeiro e segundo testes qualitativos fornecer resultado alterado, deve-se fazer um terceiro teste confirmatório quantitativo, que usa plasma ou soro^{10,15}.

Entre os métodos colorimétricos quantitativos realizados no plasma ou soro e mais difundidos para a avaliação da atividade da enzima está à liberação do ácido 4-

aminobenzóico (ácido para-aminobenzóico ou PABA) a partir do ácido biotinil-4-aminobenzóico, um análogo da biocitina. O método se baseia na mensuração da absorvância da amostra, sendo diretamente proporcional à quantidade de PABA liberado, o qual é proporcional à atividade da biotinidase¹⁵. O método de triagem (qualitativo) tem o princípio semelhante: as amostras de SIPF que apresentarem uma coloração púrpura são consideradas como tendo atividade de biotinidase, e aquelas que ficam incolor considera-se que tem pouca ou nenhuma atividade, sendo encaminhadas para a análise quantitativa da atividade da enzima.

A atividade da biotinidase também pode ser quantificada utilizando uma técnica quantitativa de fluorescência com biotinil-6-aminoquinolina como um substrato artificial¹⁶. Também existem outros métodos como a medição da liberação de biotina a partir de biocitina¹⁷, além de análogos biotinilados radioisótopos¹⁸. No entanto, todos estes métodos são mais onerosos, mais prolongados, difíceis de realizar e muitas vezes não são adaptáveis facilmente às determinações enzimáticas na utilização de sangue impregnado em papel-filtro¹⁵.

Existem fatores que podem acarretar resultados falso-positivos na análise e interpretação da atividade da biotinidase como a icterícia neonatal, a prematuridade e questões técnicas como coleta, manuseio e conservação da amostra (temperatura e umidade). Estas variáveis técnicas ocorrem mais comumente em amostras de recém-nascidos (RN) prematuros e quando as placas de triagem saturadas de sangue são colocadas em envelopes de plástico antes de estarem suficientemente secas¹⁹. Resultados falsos negativos podem ocorrer em indivíduos que são tratados com medicamentos à base de sulfas²⁰.

Considerando a incorporação da deficiência de biotinidase na fase IV do Programa Nacional de Triagem Neonatal²¹ em 2012, a importância do diagnóstico, com um controle de qualidade estabelecido e tratamento precoce desse erro inato do metabolismo para promover qualidade de vida às crianças que nascem com essa deficiência e sua alta incidência no Brasil, os objetivos deste trabalho foi estabelecer valores de referência para atividade da enzima biotinidase em adultos, RN a termo e prematuros no estado do Pará em amostras de plasma e sangue impregnado em papel-filtro. Além de definir protocolos de validação de temperatura para conservação de amostras de plasma, levando em consideração a termosensibilidade da enzima biotinidase.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM), localizado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e a coleta de dados envolveu o período de 2010 a 2016. Foram analisados dois grupos de amostras, plasma (A) e sangue impregnado em papel-filtro (B) envolvendo pessoas hígdas, as quais estavam no banco de dados do LEIM e Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. No presente estudo não foi observado sexo e se os envolvidos tinham algum quadro de icterícia, hepatite ou malária.

O grupo A foi constituído a partir dos resultados de 296 análises da enzima biotinidase no plasma: 128 RN a termo, 40 RN prematuros e 110 indivíduos adultos. Desse grupo foram excluídos da análise 18 amostras de RN, as quais apresentaram resultados $\leq 2,00$ nmol de pABA/min/mL e ficaram muito abaixo do desvio padrão em relação à média, perfazendo um total amostral de 278 amostras.

O grupo B foi constituído a partir dos resultados de 156 análises da enzima biotinidase em SIPF: 72 recém-nascidos a termo e 49 indivíduos adultos. Desse grupo foram excluídas 35 amostras, as quais apresentaram resultados $\leq 1,00$ nmol de pABA/min/mL e apresentaram atividade abaixo do desvio padrão em relação à média, perfazendo um total amostral de 121 amostras. Também não foi possível a análise de prematuros.

A quantificação da atividade da enzima, tanto nas amostras de plasma como nas de SIPF, foi determinada com base no método descrito por Knappe et al.²². Por esse método, é possível determinar a liberação de p-aminobenzoato (PABA) através do substrato artificial N-biotinil-p-aminobenzóico (B-PABA). Para ser identificado, o PABA liberado sofre diazotização. Portanto, se a biotinidase estiver presente e ativa ao final da reação, visualiza-se uma cor púrpura. Caso contrário, há desenvolvimento de cor púrpura com baixa intensidade ou incolor.

A análise foi realizada em duplicata, amostra teste e branco. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 546 nm. A atividade da enzima no plasma se dá pelo cálculo $\Delta \text{Abs} \times 9,51$ (nmol de pABA/min/mL), no qual 9,51 referem-se à constante da equação²².

A metodologia utilizada para a análise da atividade da enzima biotinidase no sangue impregnado em papel-filtro tem o mesmo princípio da usada no soro/plasma. A quantificação da atividade da enzima é feita por espectrofotômetro (comprimento de onda de 546nm) também em duplicata através da leitura da densidade óptica (DO). O cálculo da atividade da enzima segue a fórmula: $(\text{DO teste} - \text{DO branco}) \times 26,41$. A atividade enzimática é expressa em nmol de pABA/min/mL e o fator 26,41 é a constante da equação.

Investigou-se também o tempo máximo de conservação das amostras de plasma na geladeira e no freezer durante três e seis meses, respectivamente. Para tanto, foram coletadas, a partir de indivíduos adultos saudáveis, 10 amostras de plasma com heparina, das quais foram separadas duas alíquotas de 2 mL de plasma para realizar o ensaio da enzima biotinidase descrita anteriormente. Os dois grupos de alíquotas foram armazenadas em temperaturas diferentes, um grupo de alíquota na geladeira (8°C) e outro no freezer (-20°C).

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. A primeira quantificação da atividade da biotinidase foi realizada em temperatura ambiente (TA), no primeiro dia que chegaram ao LEIM. As alíquotas armazenadas na geladeira foram analisadas uma semana depois de coletadas e mais três vezes (um mês, dois e três meses) após a primeira análise. As alíquotas armazenadas no freezer foram analisadas por seis vezes (uma semana, um mês, dois, três, quatro e seis meses) após a primeira análise.

Os dados encontrados no banco de dados do LEIM foram organizados em planilhas do programa Excel 2010 da Microsoft®. A análise estatística foi feita no programa BioEstat® (versão 5.3), sendo realizada a análise de variância entre os grupos avaliados tanto para amostras de plasma quanto as de SIPF através do teste ANOVA um critério (*Tukey*) com nível de significância foi de $p < 0,01$. Para verificar a variância dos resultados das alíquotas armazenadas na geladeira e no freezer durante o tempo com relação à primeira análise foi usado o teste ANOVA um critério (*Dunnnett*) com nível de significância foi de $p < 0,05$.

Os procedimentos descritos estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética, número do parecer na Plataforma Brasil 1.762.323.

RESULTADO

Foram analisadas 278 pacientes com amostras de plasma para a atividade da enzima biotinidase. As amostras de indivíduos adultos diferiram estatisticamente dos grupos de RN ($p < 0,01$). Também foi observada diferença entre os grupos de RN ($p < 0,01$). Estes dados são demonstrados na tabela 01.

Tabela 1: Valores mínimos, máximos, média e desvio padrão para a atividade da biotinidase em amostras de plasma de adultos, recém-nascidos a termo e prematuros.

Grupo	N	Intervalo	Média±†DP
Adulto	110	3,4-11,1	7,0±1,9
RN a termo	128	3,0-5,9	4,4±0,7
RN prematuro	40	2,4-3,9	3,2±0,4
Total	278		

A atividade da enzima Biotinidase é dada em nmol de pABA/min/mL.

*RN, recém-nascido; †DP: desvio padrão; $p < 0,01$.

No mesmo período foram analisadas 72 amostras de sangue impregnado em papel-filtro de RN a termo e 49 amostras de indivíduos adultos. A tabela 2 mostra que a média da atividade da enzima biotinidase foi maior em indivíduos adultos ($p < 0,01$).

Tabela 2: Valores mínimos, máximos, média e desvio padrão para a atividade da biotinidase em amostras de sangue impregnado em papel-filtro de adultos e recém-nascidos.

Grupo	N	Intervalo	Média±†DP
Adulto	49	1,1-3,9	2,2±0,7
*RN a termo	72	1,0-2,2	1,3 ±0,2
Total	121		

A atividade da enzima Biotinidase é dada em nmol de pABA/min/mL.

*RN: recém-nascido; †DP: desvio padrão; $p < 0,01$.

Para validação do protocolo aplicado à quantificação da atividade da enzima biotinidase no plasma algumas condutas de controle de qualidade interno foram adotadas. Assim, a forma de armazenamento das amostras de plasma foi analisada para testar a conservação das mesmas em diferentes temperaturas: temperatura ambiente, geladeira (8°C) e freezer (-20°C).

A partir do primeiro mês os valores médios encontrados para as alíquotas armazenadas na geladeira não permaneceram estáveis ($p < 0,05$). Esta análise é mostrada na tabela 3.

Tabela 3: Valores máximos, mínimos, média e desvio padrão para atividade da enzima biotinidaseno plasma por tempo de conservação na geladeira.

Tempo	Mínimo	Máximo	Média\pm†DP
*TA	7,6	11,5	9,3 \pm 1,4
1 Semana	6,0	10,1	7,6 \pm 1,2
1 Mês	3,4	7,4	5,2 \pm 1,3
2 Meses	4,2	7,6	5,3 \pm 1,0
3 Meses	1,1	6,0	3,2 \pm 1,5

A atividade da enzima biotinidase é dada em nmol de pABA/min/mL.

*TA: temperatura ambiente; †DP: desvio padrão; $p < 0,05$.

Os valores médios encontrados para as alíquotas armazenadas no freezer permaneceram estáveis até o terceiro mês e a partir do quarto mês houve redução significativa em relação á primeira análise ($p < 0,05$). Esta análise é mostrada na tabela 4.

Tabela 4: Valores máximos, mínimos, média e desvio padrão para atividade da enzima biotinidaseno plasma por tempo de conservação no freezer.

Tempo	Mínimo	Máximo	Média\pm†DP
*TA	7,6	11,5	9,3 \pm 1,4
1 Semana	7,6	12,0	9,3 \pm 1,5
1 Mês	6,2	9,7	7,6 \pm 1,1
2 Meses	5,8	9,9	7,9 \pm 1,2
3 Meses	5,8	8,4	7,4 \pm 0,8
4 Meses	5,4	8,3	6,7 \pm 1,0
6 Meses	1,7	5,1	3,6 \pm 1,4

A atividade da enzima Biotinidase é dada em nmol de pABA/min/mL.

*TA: temperatura ambiente; † DP: desvio padrão; $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados encontrados e da determinação dos valores de referência de amostras de plasma de adultos, a média encontrada ($7,0 \pm 1,9$ nmol de pABA/min/mL) neste estudo foi semelhante à observada em outros estudos: $5,80 \pm 0,9$; $6,0 \pm 0,8$; $7,1 \pm$ (não informado) e $5,4 \pm 1,4$. O valor mínimo para adultos ($3,4$ nmol de pABA/min/mL) para a atividade da enzima biotinidase observado ficou levemente abaixo dos valores comumente encontrados na literatura: de $4,0$ a $4,4$ nmol de pABA/min/mL de plasma^{7,23,24,25}.

Valores abaixo do limite mínimo para a atividade da enzima biotinidase podem estar associados a características físico-químicas desta proteína, como por exemplo, termosensibilidade, ou ainda, devido uma possível inclusão de indivíduos heterozigotos para a deficiência de biotinidase. Pettit et al.²⁴, por exemplo, descreveram a atividade desta enzima para indivíduos heterozigotos como sendo de $2,2$ a $5,2$ nmol de pABA/min/mL. Deste modo, seria necessário estudo molecular do gene que codifica a proteína biotinidase para detectar indivíduos heterozigotos para a deficiência de biotinidase. De qualquer forma, esta limitação não foi considerada significativa e não impede que esses valores de biotinidase no plasma sejam validados como o intervalo de referência para adultos.

Os estudos sobre determinação da atividade da enzima biotinidase têm mostrado que os valores de referência normais usados para amostras de recém-nascidos são os mesmos utilizados para adultos²⁴. Nosso estudo, no entanto, apontou uma diferença significativa ($p < 0,01$) em relação à atividade desta enzima, sendo observados maiores valores em adultos quando comparado com os dois grupos de recém-nascidos. Também foi possível verificar que os recém-nascidos a termo apresentaram níveis de biotinidase maiores do que os observados em recém-nascidos prematuros.

Suormala et al.²⁶ mostrou que de 64 RNs avaliados, entre a termo e prematuros, 56 atingiram níveis normais de adultos entre o 4º ao 40º dia de vida e em oito a atividade da biotinidase reduziu-se durante o 3º ao 7º dia de vida, coincidindo com o período que é realizado a triagem neonatal. Desta forma, a idade gestacional pode estar diretamente relacionada à atividade da enzima biotinidase, sugerindo-se que existe a substituição de uma molécula enzimática fetal por uma adulta, madura ou devido a um período de alimentação insuficiente.

Outro estudo que avaliou a atividade da enzima biotinidase em recém-nascidos a termo, prematuros e pequenos para a idade gestacional (PIG), com e sem icterícia (considerando uma bilirrubina entre 1-4mg/dL). Este trabalho demonstrou que a atividade da enzima foi menor em prematuros ($3,3 \pm 1,2$ nmol de pABA/min/mL) e em PIG ($3,3 \pm 0,8$ nmol de pABA/min/mL) que em recém-nascidos a termo ($4,9 \pm 1,1$ nmol de pABA/min/mL)²⁷. Estes achados confirmam o que se encontrou no presente estudo, quando se evidenciou que a atividade da enzima em RN a termo é maior que em prematuro.

Outro fato a se considerar é a presença de icterícia neonatal, que, por algum mecanismo desconhecido envolvendo a bilirrubina, tende a influenciar a atividade da enzima biotinidase. No estudo de Schulpis et al.²⁷, a atividade da enzima apresentou uma relação inversa com os níveis de bilirrubina total e enzimas hepáticas e que a pré-incubação da enzima com 10-15 mg/mg/dL de bilirrubina diminui em até 50% a

atividade da biotinidase. Assim, os autores sugeriram que a diminuição da atividade da enzima em ictericos pode ser por causa do comprometimento da função hepática e que a bilirrubina total em altas concentrações pode inibir a biotinidase.

Desta forma, é importante levar em consideração, na hora de avaliar se um indivíduo se enquadra ou não na deficiência de biotinidase, se este é adulto, RN a termo ou prematuro, assim como a presença de icterícia neonatal e até mesmo se nasceu pequeno para a idade gestacional. Sendo necessárias até três coletas para confirmar o resultado, a última é realizada após três meses em relação à primeira, porém a partir do segundo teste alterado é iniciado o tratamento¹⁰.

Os valores de referência encontrados para amostras de sangue impregnadas em papel-filtro em RN a termo ($1,3 \pm 0,2$ nmol de pABA/min/mL) e adultos ($2,2 \pm 0,7$ nmol de pABA/min/mL) foram semelhantes aos observados por Costa²⁸, que sugere valores de atividade para RN a termo de 1,10 a 1,69 ($1,35 \pm 0,24$ nmol de pABA/min/mL) e, para adultos, intervalo variando de 1,41 a 3,16 ($2,13 \pm 0,47$ nmol de pABA/min/mL).

Trinta e cinco amostras de SIPF de RN a termo foram excluídas porque apresentaram valores da enzima abaixo de 1,0 nmol de pABA/min/mL. Isso pode ser devido a diversos fatores ambientais e técnicos, como por exemplo, elevada temperatura no momento do transporte para o laboratório, sangue não impregnado corretamente no papel-filtro, e formas de armazenamento inadequado das amostras¹⁰.

As amostras de SIPF usadas na triagem neonatal para RN devem estar completamente secas antes de serem enviadas para o laboratório, porque a umidade ou as amostras úmidas resultam em perda significativa da atividade enzimática^{15,23}. Estudos têm apontado que amostras armazenadas por tempo prolongado e expostas à umidade e temperatura elevada reduzem a atividade da enzima²⁷. Além disso, 50% dos falsos positivos estão associados à prematuridade²⁶.

Na avaliação de protocolos de validação, envolvendo temperaturas, a partir do primeiro mês de armazenamento das amostras de plasma em temperatura de geladeira (8°C) foi observada uma redução da atividade da biotinidase. Enquanto as amostras de plasma submetidas à temperatura de freezer (-20°C) permaneceram estáveis até o 3º mês. Esse último achado está de acordo com o estudo de Broda et al.²⁹, onde a atividade da enzima permaneceu estável no soro a -20 e -80 ° C por mais de 2 meses e pelo menos 5 meses, respectivamente.

A biotinidase pode perder atividade no plasma ou soro armazenado à temperatura ambiente ou congelado entre 4°C e -20°C. A enzima é mais estável quando armazenada a -70°C e -80°C, sendo assim é importante a conservação das amostras de plasma para ensaios de diagnóstico à -80°C^{10,30}. No estado do Pará, a temperatura e umidade elevadas podem ser um problema para a análise e interpretação da atividade enzimática da biotinidase, uma vez que o clima é Equatorial quente e úmido, necessitando de cuidados ainda maiores com relação ao armazenamento e conservação.

CONCLUSÃO

A partir do presente estudo, foi possível concluir que é necessário para a análise e interpretação da atividade da enzima biotinidase considerar se o paciente é RN a termo ou prematuro, pois esses grupos tem atividade reduzida se comparada a de um adulto, podendo contribuir para a presença de resultados falso-positivos para a deficiência de biotinidase em programas de triagem neonatal. Assim como a idade gestacional e

icterícia neonatal parece também interferir na atividade enzimática. A coleta, o manuseio e conservação das amostras também são cruciais para evitar resultados falso-positivos.

A relevância de se implantar um diagnóstico da deficiência de biotinidase, a partir da triagem neonatal, não se faz apenas pelo fato de definir números epidemiológicos da doença, mas principalmente para dar qualidade de vida para esses indivíduos, evitando e até revertendo alguns quadros sintomatológicos através de um tratamento eficiente e incipiente aos cofres públicos, quando comparado com quadros irreversíveis e que afetam o dia-dia desses pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Hart PS, Hymes J, Wolf B. Isoforms of human serum biotinidase. *Clin Chim Acta*. 1991 Mar 29;197(3):257-264.
2. Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE, Hymes J, Wolf B. Human serum Biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem*. 1994 Mar 4;269(9):6566-6570.
3. Cole H, Weremowicz S, Morton CC, Wolf B. Localization of serum Biotinidase (BTD) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics*. 1994 Aug;22(3):662-663.
4. Wolf B. Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genet Med*. 2012 Jun;14(6):565-575.
5. Combs GF. Biotin. In: Bowman BB, Rosenberg IH. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. 3th. San Diego: Else Acde Press. 2008. p. 331-344.
6. Hymes J, Wolf B. Human Biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr*. 1999 Feb;129(2 Supl):485-489.
7. Wolf B, Grier RE; Allen RJ. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr*. 1983 Aug;103(2):233-237.
8. Zempleni J, Hassan Y, Wijeratne SSK. Biotin and Biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2008 Nov1;3(6):715-724.
9. Pindolia K, Jensen K, Wolf B. Three dimensional structure of human Biotinidase: Computer modeling and functional correlations. *Mol Genet Metab*. 2007 Sep-Oct;92(1-2):13-22.
10. Ministério da saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Triagem neonatal deficiência de biotinidase. Brasília: Ministério da saúde; 2015.
11. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1991;14(6):923-927.

12. Pinto AL, Raymond KM, Bruck I, Antoniuk SA. Prevalence study of Biotinidase deficiency in newborns. *Rev Saude Publica*. 1998 Apr;32(2):148-152.
13. Neto EC *et al*. Newborn screening for Biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):295-299.
14. Luz GS, Carvalho MD, Pelloso SM, Higarashi IH. Prevalence of diseases diagnosed by the Program of Neonatal Screening in Maringa, Parana, Brazil: 2001-2006. *Rev Gaucha Enferm*. 2008 Sep;29(3):446-453.
15. Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for the diagnosis of Biotinidase deficiency. *Genet Med*. 2010 Jul;12(7):464-470.
16. Wastell H, Dale G, Bartlett K. A sensitive fluorimetric rate assay for Biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Anal Biochem*. 1984 Jul;140(1):69-73.
17. Kumasaka K *et al*. A new quantitative analytical method of serum Biotinidase activity using biocytin as a substrate and its clinical significance in Japan. *Clin Chim Acta*. 2001 Apr;306(1-2):71-77.
18. Livaniou E *et al*. Determination of serum Biotinidase activity with radioiodinated biotinylamide analogs. *Methods Enzymol*. 1997;279:442-451.
19. PerkinElmer Life and Analytical Sciences. Neonatal biotinidase kit. Wallac Oy, Turku, Finland; 2011.
20. Heard GS, Secor McVoy JR, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem*. 1984 Jan;30(1):125-127.
21. Brasil. Ministério da saúde. Portaria nº 2.816, de 14 de dezembro de 2012. Inclui a Fase IV no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), instituído pela Portaria nº 822/GM/MS, de 6 de junho de 2001. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 2012 dez17; seção 1-54.
22. Knappe J, Brummer W, Biederbick K. Purification and properties of biotinidase from swine kidney and lactobacillus casei. *Biochem Z*. 1963;338:599-613.
23. Wolf B, Heard GS, Secor MC, Grier RE. Biotinidase deficiency. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;447:252-262.
24. Pettit DA, Amador PS, Wolf B. The quantitation of biotinidase activity in dried blood spots using microtiter transfer plates: identification of biotinidase deficient and heterozygous individuals. *Anal Biochem*. 1989 Jun;179(2):371-374.

25. Kobayashi VLAV. A aplicação de métodos colorimétricos para a determinação da atividade da enzima biotinidase no plasma de humanos [Trabalho de conclusão de curso]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas; 2003. 99 p.
26. Suormala T, Wick H, Baumgartner ER. Low Biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr*. 1988 Jun;147(5):478-480.
27. Schulpis KH, Gavriili S, Tjaouranis J, Karikas GA, Kapik A, Costalos C. The effect of neonatal jaundice on Biotinidase activity. *Early Hum Dev*. 2003 May;72(1):15-24.
28. Costa LVT. Triagem neonatal para a deficiência de biotinidase em recém-nascidos na fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará [Trabalho de conclusão de curso]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas; 2009. 47 p.
29. Broda E, Baumgartner ER, Scholl S, Stopsack M, Horn A, Rhode H. Biotinidase determination in serum and dried blood spots--high sensitivity fluorometric ultramicro-assay. *Clin Chim Acta*. 2001 Dec;314(1-2):175-185.
30. Wolf B, Hymes J, Heard GS. Biotinidase. *Methods Enzymol*. 1990; 184: 103–111.

ANEXO 1- Normas da Revista

Normas para Publicação

A RPAS é de acesso aberto e não são cobradas quaisquer taxas de submissão/publicação. Segue orientações do *International Committee of Medical Journal Editors* ([ICMJE](#)) e os princípios da ética na publicação contidos no código de conduta do *Committee on Publication Ethics* ([COPE](#)).

TIPOS DE CONTRIBUIÇÕES ACEITAS

1. **Artigo original** – trabalho de pesquisa original e inédita, que contribua para o desenvolvimento do conhecimento em uma área específica. Deve ser estruturado, obrigatoriamente, em seis seções principais: Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 4.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

2. **Artigo histórico** – descreve um episódio passado ou uma personalidade que representou grande relevância à área da saúde em um campo de pesquisa, uma profissão, uma descoberta e outros. Texto dividido em seções definidas pelo autor, com títulos e subtítulos de acordo com a abordagem do assunto (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

3. Artigo de revisão

3.1) *Revisão sistemática* – revisão planejada com base no resultado de estudos originais, que procura responder, de forma sintetizada, a um objetivo específico. Descreve, criticamente e em detalhes, os procedimentos empregados na busca, seleção, análise e síntese dos dados dos estudos incluídos na revisão e que são os mais significativos ao tema abordado. Sugere-se observar o *PRISMA Statement* (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), disponível em [inglês](#) e [português](#). Deve incluir as seções: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

3.2) *Revisão narrativa* – análise crítica, de caráter descritivo-discursivo sobre tema de interesse científico à área da saúde. Deve ser elaborada somente por pesquisadores com vasta experiência na temática abordada (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

4. **Comunicação** – artigo curto sobre um trabalho científico que ainda está sendo realizado, relatando resultados preliminares de pesquisa. Tem a função de dar conhecimento à comunidade científica sobre o andamento de novas descobertas, de maneira rápida, garantindo prioridade ao autor. Deve incluir as mesmas seções que um artigo original (máximo de 2.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

5. **Relato de caso** – descrição de caso clínico importante e bem documentado do ponto de vista clínico e laboratorial. Deve conter Introdução (com breve revisão da literatura), Descrição do Caso, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 3.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

6. **Nota técnica** – contempla guias, sínteses de manuais, recomendações institucionais e roteiros (máximo de 3.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

7. **Carta ao Editor** – manifestação de opinião de leitores sobre artigos publicados pela Revista. Deve trazer comentário substanciado sobre tema publicado e/ou sobre assunto polêmico (máximo de 1.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).

CRITÉRIOS DE AUTORIA E RESPONSABILIDADE DOS AUTORES

Os critérios de autoria baseiam-se nas resoluções do ICMJE. A autoria reconhecida fundamenta-se em contribuição substancial, relacionada aos seguintes aspectos: (i) idealização e desenho do estudo, análise e

interpretação dos dados; (ii) redação ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual do manuscrito; (iii) revisão e aprovação final da versão a ser publicada; e (iv) responsabilidade por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade. Todos os designados como autores devem atender a esses critérios.

No ato da submissão, o manuscrito deve ser acompanhado da [Declaração de Responsabilidade](#), assinada por todos os autores, na qual assumem participação na elaboração intelectual de seu conteúdo e responsabilizam-se pela veracidade e originalidade do trabalho, além de atestar que o estudo não foi publicado anteriormente, parcial ou integralmente, nem encaminhado para publicação por outro periódico. Para autores de diferentes locais, é possível enviar cópias assinadas em separado.

FONTES DE FINANCIAMENTO

As fontes de financiamento – privado ou institucional – e o fornecimento de equipamentos, materiais e insumos à pesquisa de forma gratuita ou com desconto devem ser declarados pelos autores no tópico “Apoio Financeiro” dentro do manuscrito.

CONFLITO DE INTERESSES

Conflitos de interesses podem surgir quando autores, revisores ou editores possuem interesses – aparentes ou não – capazes de influenciar no processo de elaboração ou avaliação dos manuscritos. Esses conflitos podem ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira, razão pela qual os autores devem reconhecê-los e revelá-los, quando presentes, no tópico “Conflito de Interesses” dentro do manuscrito.

ASPECTOS ÉTICOS

Trabalhos envolvendo seres humanos ou animais

Devem ter a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição onde a pesquisa foi realizada e cumprir os princípios éticos contidos na [Declaração de Helsinki](#). Para pesquisas realizadas com seres humanos no Brasil, os autores devem observar as normas constantes na [Resolução CNS nº 466](#), de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, além de atender à legislação pertinente. **Enviar cópia do documento de aprovação no momento da submissão do manuscrito.** Informar, na seção “Materiais e Métodos”, o nome do CEP, o número do protocolo e a data da aprovação do projeto. Informar também se os pacientes incluídos nos estudos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e se nesse consta o compromisso de preservação da privacidade dos pacientes. Os casos omissos serão analisados pelos Editores.

Proteção dos direitos e privacidade dos pacientes que participam de pesquisas

Informações que possam identificar os participantes da pesquisa ou do relato de caso clínico não serão publicadas, a menos que seja essencial para os propósitos científicos, e o paciente ou seu responsável conceda permissão, por escrito, para a publicação. O consentimento, por escrito, para esses propósitos exige que se mostre ao paciente ou responsável o manuscrito a ser publicado. Na publicação deverá constar que se obteve a autorização. Na busca do anonimato, nunca alterar nem falsificar os dados do paciente. Omitir os detalhes que sirvam para identificar as pessoas, caso não sejam essenciais. Não usar o nome do paciente, suas iniciais ou registro que lhe tiver sido conferido no hospital, especialmente no material ilustrativo.

Padrões para apresentação de resultados de pesquisa clínica

Para manuscritos que apresentarem resultados parciais ou integrais de pesquisas clínicas, recomenda-se a

adoção dos seguintes padrões indicados pelo [ICMJE](#) e pela [Equator Network](#):

- Ensaio clínico randomizado: CONSORT ([checklist](#) e [fluxograma](#))
- Revisões sistemáticas e metanálises: PRISMA ([checklist](#) e [fluxograma](#))
- Estudos observacionais em epidemiologia: STROBE ([checklist](#))
- Relatos de casos: CARE ([checklist](#))
- Estudos qualitativos: COREQ ([checklist](#))

IDIOMA DO MANUSCRITO E TRADUÇÕES

Os textos podem ser submetidos em português, inglês ou espanhol. O Núcleo Editorial encarrega-se da tradução para os outros idiomas, sem custo aos autores.

FORMA DE APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS

Estrutura geral do documento

Os trabalhos deverão ser apresentados: em um arquivo .doc/.docx (padrão Microsoft Word); digitados para papel tamanho A4; com tipo de fonte Times New Roman, tamanho 12 pt; com espaçamento simples entre linhas e 6 pt para parágrafos em todo o texto; e margens superior, inferior, esquerda e direita igual a 3 cm. Cada arquivo (texto, figuras, documentos, etc.) não deve ultrapassar 5 MB.

Primeira página

Área do conhecimento: para facilitar a designação do artigo por tema e Editor, informar em qual área temática o artigo melhor se enquadra. Escolher dentre uma das seguintes:

- 1) Antropologia Médica
- 2) Bacteriologia e Micologia
- 3) Biomarcadores e Bioindicadores
- 4) Desenvolvimento Tecnológico e Inovação em Saúde
- 5) Educação em Saúde e Educação Ambiental
- 6) Entomologia
- 7) Farmácia
- 8) Imunologia
- 9) Odontologia
- 10) Parasitologia
- 11) Psiquiatria
- 12) Saúde e Meio Ambiente
- 13) Saúde Pública e Epidemiologia
- 14) Virologia e Arbovirologia

Título: deve ser conciso, informativo e atrativo, de modo que o tema e a área do conhecimento sejam imediatamente reconhecidos. Quando citado o nome de cidade e estado, inserir também o nome do país. Deve ser apresentado centralizado, em negrito e em minúsculo, a exceção de início de frase e nomes próprios.

Autoria: informar os nomes completos de todos os autores, sem abreviação (ao centro e em negrito). Abaixo do nome de cada autor deve conter sua respectiva afiliação completa (ao centro, normal), respeitando-se a hierarquia do órgão, seguida da indicação da cidade, do estado e do país de origem, além do ORCID e do e-mail do referido autor (Ex.: Instituto, Departamento, Laboratório, Cidade, Estado, País –

<https://orcid.org/0000-0003-3517-2227> – email@mail.com).

Resumo: deve ser apresentado no mesmo idioma do texto, digitado em um único parágrafo, com até 250 palavras. Para manuscritos do tipo Artigo Original, Comunicação e Revisão Sistemática, o resumo deve ser estruturado nas seguintes seções: Objetivo, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusão.

Palavras-chave: indicar de três a seis termos que mais representem o conteúdo central da pesquisa. Sugere-se o uso do vocabulário estruturado de [Descritores em Ciências da Saúde \(DeCS\)](#), criado pelo Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde ([BIREME](#)) com o objetivo de padronizar uma linguagem única de indexação, facilitando a recuperação de documentos científicos.

Endereço para correspondência: informar o nome e o endereço para correspondência do autor responsável pelo contato sobre o trabalho. Deve conter nome completo, endereço completo (preferencialmente institucional), telefone e e-mail.

Corpo do Texto

A estrutura do texto deverá obedecer às orientações de cada categoria de trabalho já descritas anteriormente, de modo a garantir uma uniformidade e padronização dos textos apresentados pela Revista.

Introdução – apresentação do problema, justificativa e objetivo do estudo, nessa ordem, em texto corrido, sem inserir subtópicos.

Materiais e Métodos – deve conter o detalhamento dos materiais utilizados, dos métodos aplicados e, quando pertinente, a descrição e o cálculo do tamanho da amostragem, os procedimentos de coleta de dados, entre outros, de modo que outro pesquisador possa repetir o estudo com os dados fornecidos. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas. No caso de estudo envolvendo seres humanos ou animais, observar o item **Aspectos Éticos** destas Instruções.

Resultados – apresentação dos dados obtidos com a pesquisa, sem interpretá-los ou discuti-los. Podem ser incluídas tabelas e figuras, as quais devem ser autoexplicativas e possuir chamada inserida no corpo do manuscrito, além de oferecer uma leitura direta, simples e clara (ver o item **Ilustrações** destas Instruções).

Discussão – deve apresentar a análise crítica dos resultados, suas implicações e limitações, confrontando-os com os resultados de outras publicações de relevância para o tema.

Conclusão – deve evidenciar o que foi alcançado com o estudo, relacionando os resultados obtidos com as hipóteses levantadas e sugerindo, quando necessário, outros estudos que complementem a pesquisa ou recomendações de ordem prática.

Agradecimentos – (opcional) contribuição de pessoas e/ou organismos que prestaram colaboração técnica e/ou intelectual à pesquisa.

Apoio Financeiro – indicação da existência de financiamento ao desenvolvimento da pesquisa por órgão ou instituição de fomento. Não abreviar nomes de instituições.

Conflito de Interesses – informar a existência ou não de possíveis formas de conflitos de interesse. Essa informação será publicada, caso o trabalho seja aceito.

Referências

Para citação das referências no texto, deve ser utilizado o sistema de chamada numérico sequencial (ordem de aparecimento no texto), que corresponde ao número sobrescrito, sem parêntese, disposto imediatamente após o trecho a que se refere. No caso de mais de uma citação para o mesmo trecho, os números devem ser separados entre si por vírgulas. Evitar o excesso de citação em alguns trechos, elegendo sempre as mais relevantes (máx. 6). As citações diretas (transcrições) serão aceitas apenas em artigos históricos e de antropologia médica; em outros tipos de artigos, só serão aceitas até três linhas, desde que inseridas no texto (aspadas e sem utilização de recuo).

As referências devem ser listadas ao final do manuscrito, em ordem sequencial numérica, conforme ordem de aparecimento no texto; e normalizadas segundo os [Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos](#). Em referências com mais de seis autores, deve-se listar até os seis primeiros, seguidos da expressão "et al" para os demais; títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo utilizado no [Index Medicus](#). Observar os exemplos abaixo:

a) *Artigos de periódicos:*

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006 Dec;22(12):583-8.

Carvalho RGC, Carneiro ICRS, Pinheiro MS, Pinheiro SC, Azevedo PSR, Santos SD, et al. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2010 mar;1(1):101-6.

- *Volume com parte:*

Marcus FI. Drug interaction with amiodarone. *Am Heart J.* 1983;106(4 Pt 2):924-30.

- *Volume com suplemento:*

Mirra SS, Gearing M, Nash F. Neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1997;49 Suppl 3:S14-6.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saude Publica.* 2000 jan;16supl 2:7-12.

- *Número com suplemento:*

Wise MS. Childhood nocardiosis. *Neurology.* 1998 Feb;50(2 Suppl 1):S37-42.

Mello Jorge MHP, Gawryszewski VP, Latorre MR. Análise dos dados de mortalidade. *Rev Saude Publica.* 1997 ago;31(4 supl):5-25.

- *Em fase de impressão:*

Oliveira SV, Gurgel-Gonçalves R. Análise preditiva da distribuição geográfica de hantavírus no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* No prelo 2013.

Stewart WC, Geiger AC, Jenkins JN. The benefit of repeated intraocular pressure measurements in clinical trials. *Arch Ophthalmol.* In Press 2014.

b) *Livros:*

Leão RNQ, coordenador. *Medicina tropical e infectologia na Amazônia.* Vol. 1. Belém: Samauma; 2013.

Fletcher RH, Fletcher SW, Fletcher GS. *Clinical epidemiology.* 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

- *Autoria institucional:*

World Health Organization. *Communicable disease alert and response for mass gatherings: key considerations.* Geneva: WHO; 2008.

Ministério da Saúde (BR). *Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.* 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral (Mato Grosso). *Informativo populacional e econômico de Mato Grosso: 2008.* Cuiabá: Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral; 2008.

- *Capítulos de livro:*

- Quando o autor do capítulo não é o mesmo do livro
Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1787-833.
Dewey WL, Martin BR. Abuso de drogas. In: Craig CR, Stitzel RE. *Farmacologia moderna: com aplicações clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kroogan; 2011. p. 380-94.
- Quando o autor do capítulo é o mesmo do livro
Cefrey H. Yellow fever. New York: Rosen; 2002. *Prevention and control*; p. 48-56. Contanzo LS. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. *Neurofisiologia*; p. 65-110.

c) *Teses, Dissertações e Monografias:*

Bührer-Sékula S. Simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* [thesis]. Amsterdam (NL): Royal Tropical Institute; 1998.
Queiroz ML. A hanseníase no Estado de Mato Grosso [dissertação]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Saúde Coletiva; 2009. 137 p.

d) *Portarias e Leis:*

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do SUS. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 2012 mar 29; Seção 1:95.
Brasil. Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Decreta a obrigatoriedade do Programa de Controle de Infecção Hospitalar em todos os hospitais brasileiros. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*, 1997 jan7; Seção 1:165.

e) *Anais de Congresso:*

Dittmar A, Beebe D, editors. 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology; 2000 Oct 12-14; Lyon, France. Piscataway (NJ): IEEE; 2000. 643 p.
Anais do 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2015 jun 14-17; Fortaleza, Brasil. Brasília (DF): Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2015. 2078 p.

f) *Trabalho de evento publicado em periódico:*

Ohnishi MDO, Ventura AMRS, Libonati RF, Souza JM. O pulmão na malária *vivax*: relato de caso. In: 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2º Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul e 3º Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa; 2008 mar 4-7; Porto Alegre, RS. Brasília (DF): Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2008. p. 215. (*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; vol. 41; supl. 1).

g) *Documentos eletrônicos:*

- *Livros e periódicos na Internet*

World Health Organization. *International health regulations: 2005* [Internet]. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2008 [cited 2013 Dec 11]. Available from: <http://www.who.int/ihr/publications/9789241596664/en/>.

Lucena AR, Velasco e Cruz AA, Cavalcante R. Estudo epidemiológico do tracoma em comunidade da Chapada do Araripe - Pernambuco Brasil. *ArqBrasOftalmol* [Internet]. 2004 mar-abr [citado 2004 jul 12];67(2):197-200. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v67n2/19740.pdf>.

- *Websites e base de dados na Internet*

PubMed Central [Internet]. Bethesda (MD): NCBI/NLM; 2015 [updated 2014 Aug 15; cited 2015 Feb

10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Pará [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2015 [citado 2015 mar 23]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=15&search=para>.

Ilustrações

São aceitas, no máximo, seis ilustrações, que podem ser do tipo tabela, quadro, figura, gráfico ou mapa (cada arquivo não deve ultrapassar 5 MB). Caso os autores julguem essencial que uma determinada ilustração permaneça, se extrapolado o número máximo permitido, solicita-se um contato especial com o Núcleo Editorial. Cada ilustração deve ser apresentada em folha separada ao final do artigo, numerada na ordem de aparecimento no texto e conter um título sucinto, porém explicativo, bem como suas respectivas legendas (quando houver). Ilustrações que não sejam de autoria dos mesmos autores do manuscrito só serão publicadas caso o criador/produtor/autor da ilustração conceda autorização para publicação nesta Revista.

- Tabelas e quadros:

Devem complementar, e não duplicar, o texto. Recomenda-se seguir [Normas de Apresentação Tabular](#) da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas (rodapé) da tabela/quadro e não no título, identificadas por símbolos nesta ordem: * , † , ‡ , § , || , ¶ , ** , †† , ‡‡ . Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas/quadros e não usar espaços para separar colunas. Para as células que apresentarem dado com valor igual a zero, substituir o "0" por "-" e inserir no rodapé a seguinte nota: "Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento".

- Figuras:

Podem ser submetidas em preto ou em cores. Fotografias e mapas devem ser enviados sob a forma de arquivos nos formatos JPG ou TIFF, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Imagens geradas em computador, como gráficos e esquemas, podem ser anexadas sob os formatos DOC, XLS, PSD, ou CDR. O Núcleo Editorial reserva-se o direito de configurar o material ilustrativo de modo mais econômico, desde que não prejudique sua apresentação. Os autores são convidados a submeter, para consideração da Revista, ilustrações de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Unidades de medida

As unidades de medida devem seguir os padrões do [Sistema Internacional de Unidades](#).

Siglas e Acrônimos

Siglas são palavras formadas a partir da redução de um grupo de palavras, onde cada letra é pronunciada separadamente (Ex.: OMS – Organização Mundial da Saúde, AVC – acidente vascular cerebral); escritas em maiúsculas, a exceção das originalmente grafadas de forma diferenciada (Ex.: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Acrônimos são palavras formadas a partir da junção de letras ou sílabas iniciais de um grupo de palavras, formando vocábulos. São escritos apenas com a inicial maiúscula (Ex.: Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz, Funasa – Fundação Nacional de Saúde), a exceção das que possuem menos de quatro letras que devem ser grafadas todas em maiúsculas (Ex.: ONU – Organização das Nações Unidas).

Para siglas e acrônimos estrangeiros, recomenda-se a designação correspondente em português, se a forma traduzida for largamente aceita; ou sua utilização na forma original se não houver correspondência em português, ainda que o nome por extenso em português não corresponda à sigla. (Ex: UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, CDC – Centers for Disease Control and Prevention).

Em sua primeira aparição no texto, siglas e acrônimos deverão ser escritos por extenso e acompanhados da respectiva redução entre parênteses. A partir daí, utilizar apenas a sigla ou acrônimo no restante do texto.

Um caso excepcional é o da palavra "aids" (síndrome da imunodeficiência adquirida), que o Conselho Nacional de Aids, do Ministério da Saúde, recomenda, dada a popularização do acrônimo original "Aids – acquired immunodeficiency syndrome", que seja grafada em minúsculas, representando o nome da doença.

ENVIO DE MANUSCRITOS

Os trabalhos devem ser enviados por meio do [Sistema de Submissão da Revista](#). Juntamente com o arquivo do manuscrito, os autores devem enviar a "[Declaração de Responsabilidade](#)", assinada por cada um deles, digitalizada em formato PDF.

Os autores podem enviar um documento à parte com a indicação de até três possíveis revisores, também especialistas no assunto abordado em seu manuscrito. É possível ainda indicar até três revisores especialistas para os quais não gostariam que seu manuscrito fosse submetido. Caberá aos Editores a decisão de acatar ou não as sugestões dos autores.

AValiação E Publicação

Depois de submetido, o trabalho passa por 11 etapas no trâmite editorial. Ressalta-se que ele só passará para a fase seguinte se aprovado na anterior. São elas:

1) Análise inicial: realizada pelos Editores Chefes e Científicos,

2) Análise técnica: realizada pelo Núcleo Editorial, que verifica se o manuscrito foi formatado segundo essas normas e se o assunto se enquadra no escopo da Revista; além de realizar a busca por possíveis transcrições sem o devido crédito à fonte original ou qualquer outro ponto que possa atestar contra sua originalidade.

3) Análise de Editor Associado: realizada por um Editor Associado, designado com base na área do manuscrito, que analisa seu potencial para publicação e seu interesse para os leitores da Revista, além de verificar se os preceitos éticos foram obedecidos. Trabalhos que não atenderem a essas exigências serão recusados.

4) Análise de mérito científico: após a avaliação pelo Editor, os manuscritos serão enviados para avaliação "cega" (não identificada) por dois revisores especialistas (*peerreviewers*). No caso de pareceres divergentes, um terceiro será consultado. A partir dos pareceres recebidos, os Editores poderão considerar o manuscrito: (i) Aceitável para publicação; (ii) Aceitável, condicionado a reformulação; ou (iii) Não aceitável. Os trabalhos aceitos para publicação, porém condicionados à reformulação, serão enviados aos autores com prazo definido para devolução do manuscrito reformulado ao Núcleo Editorial. Uma vez aprovado para publicação, se, todavia, for identificada a necessidade de pequenas correções e ajustes no texto, os Editores da Revista reservam-se o direito de fazê-lo.

5) Revisão textual: de posse do manuscrito reformulado pelos autores, o Núcleo Editorial encaminha-o para normalização e revisão ortográfica e gramatical. O texto revisado é devolvido aos autores para aprovação e uma resposta deve ser dada até o prazo estipulado; caso contrário, todas as modificações serão consideradas

aceitas. No caso de haver comentários, todos deverão ser respondidos pelos autores.

6) Avaliação final: onde o artigo, agora reformulado e revisado, retorna aos pareceristas para aprovação de sua versão final.

7) Aprovação: finalmente, a decisão definitiva pela publicação do manuscrito será condicionada à aprovação final dos pareceristas e ao atendimento de todos os requisitos estabelecidos nestas normas. A comunicação oficial será enviada por e-mail ao autor de correspondência.

8) Diagramação: fase em que o manuscrito ganha o formato de como será publicado.

9) Leitura de prova: o artigo diagramado na versão final a ser publicada é então encaminhado por e-mail, em formato PDF, ao autor de correspondência para ser lido, verificado e aprovado pelos autores, o qual deverá também assinar e enviar, em formato PDF ou JPG, a Declaração de Transferência de Direitos Autorais Patrimoniais para Publicação. Para não comprometer a publicação do trabalho, a resposta sobre a aprovação ou não da prova e o envio da Declaração assinada devem cumprir o prazo estipulado. Inclusões de informações não serão aceitas nesta fase.

10) Publicação: fase final em que o manuscrito está pronto e apto para inclusão em um dos fascículos da Revista. A publicação está condicionada ao recebimento, pelo Núcleo Editorial, do documento de transferência de direitos assinado.

11) Tradução: todos os artigos publicados são traduzidos pelo Núcleo Editorial para os outros dois idiomas, sem custos aos autores. A versão traduzida, já diagramada, é encaminhada ao autor de correspondência para aprovação e, então, publicada eletronicamente.

Toda vez que o manuscrito passar para uma próxima fase, é enviado um comunicado por e-mail ao autor de contato para acompanhamento.

DIREITO DE REPRODUÇÃO

Os manuscritos publicados pela Revista Pan-Amazônica de Saúde são de propriedade de seus respectivos autores. Entretanto, sua reprodução – total ou parcial – por outros periódicos ou meios de comunicação, tradução para outro idioma ou criação de vínculos eletrônicos são permitidas somente mediante autorização expressa dos Editores.

ANEXO 2- Comitê de Ética

FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ -
FSCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ICTERÍCIA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO TARDIOS PODE INTERFERIR NA ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE

Pesquisador: Carla Leonor Melo Vinagre Machado

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 1

CAAE: 57610016.0.0000.5171

Instituição Proponente: Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.762.323

Apresentação do Projeto:

A literatura tem evidenciado que RN prematuros com função hepática alterada, apresentavam diminuição da atividade da enzima biotinidase. Os autores pretendem estudar a atividade da enzima biotinidase em RNs a termo (com 37 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional) e Pré-termo tardios (com 34 a 36 semanas e seis dias de idade gestacional) com a finalidade de diferenciar a deficiência de biotinidase transitória, por imaturidade hepática, em prematuros, daquela permanente, por erro inato do metabolismo. O tipo de estudo será observacional analítico, tipo caso-controle. Serão avaliados dois grupos de RN: RN a termo e RN Pré- termo Tardios. As

amostras de sangue de RN com icterícia serão provenientes do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a atividade da enzima biotinidase em RNs a termo (com 37 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional) e Pré-termo tardios (com 34 a 36 semanas e seis dias de idade gestacional).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na pesquisa haverá riscos inerentes a punção venosa periférica, como hemorragias e etc.

Quanto aos Benefícios, o estudo proporcionará o diagnóstico da deficiência de biotinidase permanente ou erro inato do metabolismo aos Rns que participarem do estudo, além de contribuir para um melhor manejo terapêutico dos mesmos.

FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ -
FSCMPA



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo reveste-se de importância científica e apresenta metodologia que permite alcançar os objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

Recomendações:

Os autores devem apresentar relatório das atividades da pesquisa, informando as possíveis mudanças na metodologia durante o desenvolvimento do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra critérios éticos para o seu desenvolvimento, considerado como Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_574208.pdf	10/06/2016 17:30:42		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	10/06/2016 17:29:35	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	09/06/2016 13:02:57	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_PROJETO.pdf	09/06/2016 13:01:45	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
Outros	TERMO_DE_ACEITE_2.pdf	08/06/2016 12:27:39	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
Outros	TERMO_DE_ACEITE.pdf	08/06/2016 12:26:38	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO.pdf	08/06/2016 12:22:59	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	08/06/2016 12:20:18	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	08/06/2016 12:20:18	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito

FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ -
FSCMPA



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BELEM, 05 de Outubro
de 2016

Assinado por:

**LIENE DO SOCORRO
CAMARA XIMENES
(Coordenador)**