

# RELAÇÃO DAS HORMONAS TIROIDEIAS COM A ACTIVIDADE SÉRICA TOTAL E ESPECÍFICA DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE

CRISTINA PINTO, A. GALVÃO-TELES, C. MARQUES, CARLOS MANSO

Instituto de Química Fisiológica. Serviço de Medicina II. Hospital de Santa Maria. Lisboa

## RESUMO

Doseou-se a N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) sérica total, bem como os seus principais isoenzimas A (termolábil) e B (termo-estável) em indivíduos de ambos os sexos com eutiroidismo, hipertiroidismo e hipotiroidismo. Nos hipertiroideus ( $n=20$ ), os níveis da NAG total expressa em nmoles/ml/h -  $865,9 \pm 122,676$  (média e desvio padrão), do Isoenzima A -  $490,3 \pm 93,592$  e Isoenzima B -  $361,6 \pm 66,371$ , encontram-se elevados relativamente aos valores dos hipotiroideus: NAG total -  $533,105 \pm 97,927$  ( $p < 0,001$ ); Isoenzima A -  $280,263 \pm 61,436$  ( $p < 0,001$ ); Isoenzima B -  $251,580 \pm 50,530$  ( $p < 0,001$ ); Isoenzima A -  $316,85 \pm 55,00$  ( $p < 0,001$ ); Isoenzima B -  $238,95 \pm 39,60$  ( $p < 0,001$ ). Procedeu-se com intervalos de 1 mês ao doseamento enzimático total e específico em sete hipotiroideus, submetidos, respectivamente, à terapêutica com L-tiroxina (LT<sub>4</sub> - doses de 0,1 - 0,2 mg/dia) e Propiltiuracilo (doses de 0,3 - 0,4 g/dia). Utilizaram-se os doseamentos das hormonas tiroideias T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> e da THS como critério de evolução. A redução da actividade hormonal em 7 hipertiroideus acompanhou-se de uma diminuição significativa da actividade enzimática (NAG total:  $p < 0,02$  e Isoenzima A:  $p < 0,02$ ). As alterações do isoenzima B não foram significativas. Em 4 hipertiroideus não se observou diminuição da actividade total e específica da NAG embora os níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> do soro tivessem normalizado, mantendo todavia os doentes alguns sinais e sintomas do hipertiroidismo. Nos hipotiroideus submetidos à L-tiroxina a NAG total, Isoenzima A e Isoenzima B elevaram-se de forma significativa ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$  respectivamente).

## SUMMARY

### Relationship of Thyroidal Hormones with the Total and Specific Serum Activity of N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase

Total serum N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), isoenzyme A (labile) and isoenzyme B (stable) activities were determined in euthyroid controls and in thyroid disease. In twenty hyperthyroid individuals total NAG ( $856,9 \pm 122,676$  nmols/h/ml and isoenzyme A ( $490,3 \pm 93,592$ ) as well as isoenzyme B ( $361,6 \pm 66,371$ ), were higher than the levels in nineteen hypothyroids [total NAG =  $533,105 \pm 97,927$  ( $p < 0,001$ ); isoenzyme A =  $280,263 \pm 61,436$  ( $p < 0,001$ ); isoenzyme B =  $251,580 \pm 50,530$  ( $p < 0,001$ )] or in twenty euthyroids [total NAG =  $555,55 \pm 75,59$  ( $p < 0,001$ ); isoenzyme A =  $316,85 \pm 55,0$  ( $p < 0,001$ ); isoenzyme B =  $238,95 \pm 39,60$  ( $p < 0,001$ )]. Monthly assays were performed in seven hypothyroids and eleven hyperthyroids over the course of their corrective treatment with L-thyroxine (LT<sub>4</sub>: 0,1-0,2 mg/day) and propylthiuracil (PTU: 0,3-0,4/day), respectively. Total T<sub>4</sub> was taken as the criterion for thyroid status. The reduction of hormone activity in seven hyperthyroids was accompanied by a significant decrease in enzyme activity (NAG =  $p < 0,02$ ; isoenzyme A =  $p < 0,02$ ). Isoenzyme B displayed no significant variation. In four hyperthyroids submitted to treatment with PTU there was no reduction in NAG activity and although T<sub>4</sub> came down to normal levels. These patients still displayed symptoms of hyperthyroidism. In the hypothyroid groups treated with L-tiroxine, total NAG and isoenzyme A activities increased, with highly significant values ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ), as well as the isoenzyme B activity, comparing levels before and after the treatment ( $p < 0,001$ ).

## INTRODUÇÃO

Os enzimas lisosómicos como a N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (EC 3-2-30) estão implicados no catabolismo das glucoproteínas, glucosaminoglicanos e proteoglicanos<sup>1</sup>. A regulação da sua actividade parece estar sob o controle de um grande número de influências genéticas e humorais. Tem-se demonstrado que a concentração da NAG no soro e outros líquidos orgânicos constitui um índice para o diagnóstico, a evolução e o prognóstico de diversos tipos de patologia — mucopolidoses, patologia hepática e renal, diabetes mellitus, doenças do foro gastrointestinal, cardiovascular e doenças cancerígenas<sup>2-4</sup>.

Cotes et al<sup>5</sup> após a administração de L-tiroxina a ratos adultos demonstraram um aumento da actividade de três  $\beta$ -glicosidases ácidas ( $\beta$ -galactosidase ácida, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase e  $\beta$ -glucuronidase) no tecido hepático.

As hormonas tiroideias alteram a actividade total dos enzimas lisosómicos no fígado sem afectar a sua distribuição nas diferentes fracções celulares, ao contrário do que se passa com a glucagina ou com a insulina<sup>10</sup>.

Os enzimas lisosómicos não proteolíticos, incluindo a fosfatase ácida, a  $\beta$ -galactosidase, a NAG e a L-manosidase, alteram-se no soro em paralelo com as proteases no fígado e músculo esquelético<sup>11</sup>. Alterações concomitantes no conteúdo de todos estes enzimas podem resultar de variações

quer no número de lisosomas por célula, quer no número de enzimas por lisosoma.

Dado que a  $T_3$  e a  $T_4$  também controlam os níveis lisosómicos de RNase, DNase e lipases ácidas<sup>9</sup> é lícito admitir que o *turnover* dos constituintes celulares não proteicos também pode ser regulado pelas hormonas tiroideias.

Foi demonstrado por Oberkotter et al<sup>12</sup> que a tiroxina aumenta a actividade da NAG total e do isoenzima A no fígado do rato, não se verificando alterações no isoenzima B (termoestável). Os mesmos autores observaram num grupo de indivíduos do sexo feminino na puberdade uma elevada correlação entre a actividade total da NAG e os níveis da  $T_4$ , com uma elevação selectiva do isoenzima A.

A finalidade deste trabalho foi a de estudar a actividade total e específica da NAG em adultos com hiper e hipotiroidismo, efectuando, igualmente, doseamentos periódicos nos indivíduos submetidos à terapêutica hormonal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudaram-se 20 doentes com hipertiroidismo, 16 do sexo feminino e 4 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 11 e os 65 anos (idade média — 35 anos) e 19 doentes com hipotiroidismo, 12 do sexo feminino e 7 do sexo masculino com idades entre os 13 e os 60 anos (idade média — 30 anos), da Consulta de Endocrinologia do Hospital de Santa Maria. Com intervalos de 1 mês foram estudados com doseamentos periódicos da NAG total e específica, enquanto faziam terapêutica, até atingirem o estado de eutiroidismo, onze hipertiroideus (8 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, com idades entre os 36 e os 53 anos — idade média 44 anos) e sete hipotiroideus (5 do sexo feminino e 2 do sexo masculino: 14-60 anos, média 40 anos).

Como controlos eutiroides estudaram-se 20 dadores do Posto Avançado do Serviço de Transfusões de Sangue do Hospital de Santa Maria, sem evidência clínica ou laboratorial de qualquer tipo de patologia.

A função tiroideia foi avaliada por doseamento por radioimuno ensaio da  $T_3$  total,  $T_4$  total e THS do soro. Utilizaram-se kits comerciais (Amerlex); com os seguintes valores de referência:  $T_4$ : 4,2 - 11,5  $\mu\text{g/ml}$ ;  $T_3$ : 0,5 - 2,2 ng/ml; THS: <0,6 - 6  $\mu\text{U/ml}$ .

A NAG sérica total foi determinada por doseamento fluorimétrico, pelo método de Leback e Walker<sup>13</sup> com o 4-

-metilumbeliferil glucosaminido como substrato fluorigénico, sendo a 4-metilumbeliferona (4 MU) libertada pela reacção convertida para a sua forma aniónica altamente fluorescente, pela adição de Tampão alcalino e o produto da reacção doseado fluorimetricamente. A actividade enzimática específica foi doseada pelo método de Oberkotter et al<sup>12</sup>, recorrendo-se ao mesmo substrato. A actividade enzimática é referida em nmoles de 4-MU liberta por hora a 37° C, expressa em unidades por ml.

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa em jejum, e, submetidas à centrifugação, dividindo-se o sobrenadante em 2 partes alíquotas e procedendo-se imediatamente aos doseamentos hormonais e da actividade da NAG, ou congelando-se os soros a -20° C até às referidas determinações num período inferior a 15 dias.

O substrato fluorigénico e o padrão 4-MU foram da Sigma.

As restantes soluções empregues, todas do grau reagente, da Merck.

A análise estatística dos dados incluiu o cálculo das médias, desvio padrão e variâncias. Baseado nas variâncias observadas foi utilizado o Teste de Student para determinar os níveis de significância. Recorreu-se à regressão linear para o Traçado das Rectas, utilizando o método dos mínimos quadrados.

## RESULTADOS

O Quadro 1 mostra que a diferença da actividade NAG total dos hipertiroideus vs eutiroides e hipotiroideus é altamente significativa ( $p < 0,001$ ), sendo igualmente significativas as actividades do enzima Termolábil A ( $p < 0,001$ ) e Termoestável B ( $p < 0,001$ ).

As actividades enzimáticas dos eutiroides comparadas com as dos hipotiroideus não são significativas no que diz respeito à NAG total e isoenzima B, mas ligeiramente significativas as actividades do isoenzima Termolábil A ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que a normalização das provas da função tiroideia foi acompanhada por uma redução da actividade da NAG tanto total como específica; o período de duração da terapêutica variou entre os 2 e 11 meses, ou seja, para cada caso foram efectuadas determinações, oscilando entre um total de 2 a 11.

QUADRO 1—Provas da função tiroideia vs actividade NAG total e específica (nmoles de 4MU/ml/h)

Estado	$T_3$	$T_4$	TSH	Actividade NAG (nmoles/ml/h)		
				NAG total	A	B
I Hipertiroideus (n=20)	3,197 ± 1,691	17,263 ± 2,953	1,541 ± 0,662	856,9 ± 122,676	490,3 ± 93,592	361,6 ± 66,371
II Eutiroides (n=20)	1,083 ± 0,497	7,680 ± 1,501	1,977 ± 0,756	555,55 ± 75,59	316,85 ± 55,00	283,95 ± 39,60
III Hipotiroideus (n=19)	0,511 ± 0,422	3,215 ± 2,750	50,535 ± 26,129	533,105 ± 97,927	280,263 ± 61,436	251,580 ± 50,530

### Teste de Student

I vs II	t= 5,095	t= 12,353	t= 1,865	t= 8,885	t= 6,778	t= 6,713
	p<0,001	p<0,001	p= n.s.	p<0,001	p<0,001	p<0,001
I vs III	t= 6,396	t= 14,743	t= 8,165	t= 8,616	t= 7,819	t= 5,485
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
II vs III	t= 3,707	t= 6,171	t= 8,092	t= 0,762	t= 1,961	t= 0,826
	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p= n.s.	p= 0,05	p= n.s.

**QUADRO 2**— Actividade NAG total, A e B (nmoles/ml/h) num grupo de 7 hipotiroideos submetidos à terapêutica com Propiltiuracilo até ao estado eutiroideu e normalização da actividade enzimática. Os valores referem-se à actividade enzimática e da função tiroideia antes e depois da terapêutica (as colheitas foram efectuadas periodicamente com intervalos de 1 mês). Os casos estão numerados de 1 a 7.

N.º de casos e duração da terapêutica	T <sub>3</sub> (0,5-1,9 ng/ml)		T <sub>4</sub> (4,2-11 µg/ml)		THS (0,6-6 µU/ml)		Actividade NAG (nmoles/ml/h)					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	NAG total		A		B	
							Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
N.º 1 (2 meses)	3,9	2,06	14,09	9,37	0,46	0,65	617	580	396	378	221	221
N.º 2 (9 meses)	2,58	1,07	16,0	11,0	1,76	1,39	753	491	461	340	287	151
N.º 3 (2 meses)	2,79	0,91	15,03	8,98	0,95	0,99	684	538	440	388	244	150
N.º 4 (10 meses)	3,32	1,07	13,59	10,14	1,3	0,6	677	480	378	320	299	160
N.º 5 (11 meses)	1,9	0,97	20,0	11,0	1,2	1,45	707	407	413	220	294	187
N.º 6 (9 meses)	3,20	2,07	20,9	11,0	1,2	1,52	806	479	590	343	216	136
N.º 7 (10 meses)	0,95	0,88	15	9,9	1,2	1,19	656	535	377	304	279	231

**QUADRO 3**— Actividade NAG total, A e B (nmoles/ml/h) num grupo de 4 hipertiroideos submetidos à terapêutica com Propiltiuracilo até ao estado de eutiroideus definido pelas provas da função tiroideia mas com manutenção da sintomatologia clínica, não se verificando uma normalização da actividade enzimática. Os valores referem-se à actividade enzimática e da função tiroideia antes e depois da terapêutica (colheitas efectuadas periodicamente com intervalos de 1 mês)

N.º de casos e duração da terapêutica	T <sub>3</sub> (0,5-1,9 ng/ml)		T <sub>4</sub> (4,2-11 µg/ml)		THS (0,6-6 µU/ml)		Actividade NAG (nmoles/ml/h)					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	NAG total		A		B	
							Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
N.º 1 (14 meses)	2	1,36	17,5	7,8	1,04	0,94	926	959	500	550	426	409
N.º 2 (10 meses)	4,43	1,31	20,37	10,05	1,15	0,64	733	760	423	550	310	210
N.º 3 (4 meses)	3,61	1,6	17,2	10,0	0,83	0,6	694	700	410	435	284	265
N.º 4 (10 meses)	1,57	1,04	23,3	10,6	0,8	1,45	856	888	454	560	402	328

A análise do quadro 3 revela que a normalização das provas da função tiroideia não foi acompanhada por uma redução da actividade total e específica da NAG; o período da instituição da terapêutica oscilou entre os 4 e 14 meses, com doseamentos periódicos mensais de 4 a 14.

Há uma elevação da actividade total e específica da NAG acompanhando a normalização das provas de função tiroideia, variando o período da duração da terapêutica entre os 2 e os 8 meses, com uma evolução laboratorial implicando idêntico número de determinações (Quadro 4).

**QUADRO 4**— Actividade NAG total, A e B expressa em nmoles/ml/h num grupo de 7 hipotiroideos controlados com L-Tiroxina (dose de 0,1-0,2 mg/dia) até ao estado eutiroideu e normalização da actividade enzimática, com colheitas periódicas intervaladas de 1 mês, referindo-se os valores às provas de função tiroideia e actividade enzimática antes e depois da terapêutica

N.º de casos e duração da terapêutica	T <sub>3</sub> (0,5-1,9 ng/ml)		T <sub>4</sub> (4,2-11 µg/ml)		THS (0,6-6 µU/ml)		Actividade NAG (nmoles/ml/h)					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	NAG total		A		B	
							Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
N.º 1 (4 meses)	0,88	1,71	2,1	10,2	63,15	3,1	446	730	260	440	186	290
N.º 2 (4 meses)	0,81	1,09	2,0	5,17	31,15	3,19	481	527	280	360	201	167
N.º 3 (5 meses)	0,63	0,58	2	10,72	21,12	2,46	350	551	270	366	80	185
N.º 4 (3 meses)	1,0	0,66	3,2	8,8	12,5	1,6	365	443	230	268	135	181
N.º 5 (8 meses)	0,68	1,23	4,2	11,0	14,3	5,36	526	666	306	415	220	251
N.º 6 (2 meses)	1,06	1,45	3,4	8,45	8,7	2,0	295	643	189	375	106	268
N.º 7 (3 meses)	0,85	1,06	4,6	8,7	34	4,3	586	706	300	456	286	250

## DISCUSSÃO

Oberkotter et al<sup>14</sup> referiram uma correlação significativa entre a actividade sérica total e específica da NAG e o estado tiroideu de adolescentes do sexo feminino, ao doseamento sequencial da NAG a par das provas da função tiroideia ao longo do tratamento a que estes doentes hipertiroideus e hipotiroideus foram submetidos, respectivamente a Propiltiuracilo e a L-Tiroxina. Verificaram que a normalização da actividade hormonal foi acompanhada nos casos de hipertiroidismo por uma redução significativa da actividade da NAG total e do isoenzima Termolábil A e nos casos de hipotiroidismo por uma elevação igualmente significativa dessas mesmas actividades enzimáticas. Não se observaram alterações significativas no isoenzima Termolábil B. Assim, o efeito hipertiroideu no nível sérico do enzima lisosómico não era global, tornando-se evidente que a elevação do nível hexosaminidase sérica estava relacionada com a actividade do isoenzima Termolábil A, aspecto particularmente importante na medida em que o isoenzima A está deficiente em vários tipos de doenças metabólicas congénitas, como por exemplo as gangliosidoses GM<sub>2</sub>.

Numa comunicação preliminar estudando uma população adulta<sup>15</sup> confirmamos os resultados de Oberkotter et al<sup>14</sup> embora tivéssemos obtido correlações menos significativas tanto para a actividade total como específica da NAG comparada com a T<sub>4</sub> total.

Atribuímos o facto ao catabolismo das glucoproteínas ser menos acentuado no estado adulto do que na adolescência caracterizada por uma maior actividade metabólica.

A interpretação das alterações das hidrolases ácidas é controversa.

A presença da hormona tiroideia parece ser directamente responsável pelo aumento dos níveis séricos dos enzimas lisosómicos como a NAG e a glucuronidase<sup>16</sup>. Assim o provam a correlação entre as actividades da NAG total e específica e os níveis de T<sub>4</sub>, nos estudos já referidos, a redução dos valores enzimáticos em doentes hipertiroideus após o tratamento com Propiltiuracilo, bem como a elevação da NAG após o tratamento dos doentes hipotiroideus com L-Tiroxina. De Martino et al<sup>17</sup> demonstraram que as hormonas estimulavam a biossíntese dos enzimas lisosómicos hepáticos e esqueléticos mesmo fora dos produtos de crescimento e diferenciação dos tecidos.

Segundo Weissman et al<sup>16</sup>, é improvável que a glândula tiroideia seja por si só o indutor da síntese dos enzimas lisosómicos, dado que a administração da Triiodotironina induz níveis muito elevados da actividade sérica enzimática. A elevação dos níveis das glucosidades pode, assim, representar um aumento da síntese ou libertação do enzima dos tecidos tornados hipermetabólicos pela administração da hormona tiroideia.

Entre as várias hipóteses propostas para o aumento dos níveis séricos nos doentes hipertiroideus podíamos considerar uma modificação da permeabilidade da membrana ou um aumento na destruição celular, ou, ainda, um reflexo do estímulo da exocitose resultante de um elevado metabolismo celular.

Uma diminuição na velocidade da depuração das hidrolases ácidas também pode ser responsável pela sua elevação. Knook et al<sup>18</sup> sugeriram que o aumento dos níveis das glucosidades séricas em determinada patologia pode estar ligado a alterações estruturais nos enzimas, com incapacidade de reconhecimento por parte das células hepáticas, impedindo assim a sua depuração plasmática.

Estes enzimas são eliminados da circulação principalmente por um processo de endocitose pelas células de Kuppfer mediado por receptores específicos da membrana<sup>19</sup>.

A redução ou inactivação destes receptores pode alterar todo este mecanismo.

O doseamento da NAG não será talvez específico do diagnóstico da patologia tiroideia, dado que se observam alterações da sua actividade em várias outras situações<sup>20</sup>.

Neste estudo demonstramos que a determinação sequencial da actividade sérica total e específica da NAG oferece um meio quantitativo de seguir a evolução da resposta terapêutica na disfunção tiroideia. O valor da actividade enzimática da NAG é ainda relevante se atendermos ao facto de que a administração de compostos iodados ou outras drogas alteram as provas convencionais da função tiroideia.

Um outro aspecto importante é que num subgrupo dos hipertiroideus submetidos à terapêutica com Propiltiuracilo, assistimos à normalização dos níveis da hormona tiroideia não acompanhados pela redução que seria de prever tanto na actividade total da NAG como na do isoenzima Termolábil A e Termoestável B. Este grupo de indivíduos mantém sinais e sintomas clínicos de hipertiroidismo e seria interessante verificar na sequência da evolução patológica qual o significado ou valor prognóstico da manutenção desses enzimáticos elevados, alargando inclusivamente o estudo a grupos mais amplos.

## Colaboração Técnica:

Maria do Céu Menezes

## BIBLIOGRAFIA

1. STRECKER, G.; MONTREUIL, J. *Biochemie*, 1979; 61: 1199.
2. VING KIN, N.M.K.; WOLFE, L.S. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1974; 59: 837.
3. ABE, H. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968; 151: 628.
4. DANCE, N.; PRICE, R.G. *Clin. Chim. Acta*, 1970; 27: 87.
5. FUSHIM, H.; TARNI S. *Clin. Chim. Acta*, 1976; 71: 1.
6. MIAN, N.; HERRIES, D.G.; COWEN, D.M.; E.A. *Biochem. J.*, 1979; 177: 319.
7. MANSSEL, M.A.; ZIROYANNIS, P.N.; JONES, N.F.; MARSON, W.S. *The Lancet*, Oct. 1978; 14: 803.
8. TANAKA, T.; KABAYASHI, M.; SAITO, O.; KAMADA, N.; KURAMOTO, A.; USUI, T. *Clin. Chim. Acta*, 1981; 117: 121.
9. COTES, P.M.; BROWN, S.A.; LAN, H.; KRULICH, L.; KOLDOVSKY, O. *Febs Letters*, 1978; 86: 45.
10. DETER, R.L. *J. Cell Biology*, 1971; 48: 473.
11. DE MARTINO, G.; GOLDBERG, A. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1978; 75: 1369.
12. OBERKOTTER, L.; TENORE, A.; PALMIERI, MAND KOLDOVSKY, O. *Clin. Chim. Acta*, 1979; 94: 281.
13. LEABACK, D.H.; WALKER, P.G. *Biochem. J.*, 1961; 78: 151.
14. OBERKOTTER, L.; TENORE, A.; KOLDOVSKY, O. *Clin. Chim. Acta*, 1980; 108: 61.
15. PINTO, C.; GALVÃO-TELES, A.; MARQUES, C.; PEREIRA DA SILVA, A.; MANSO, C. *Abst. Coloquio de Endocrinologia de Outono e Inverno, Vimeiro*, 1983.
16. WEISSMAN, G.; SEGAL, R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1970; 134: 812.
17. DE MARTINO, G.N.; A.L. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1978; 75: 1369.
18. KNOOK, D.L.; SLEYSER E. *Ch. Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1980; 96: 250.
19. ULLRICH, K.; GIESELMANN, V.; MERSMANN, G.; VON FIGURA, K. *Biochem. J.*, 1979; 182: 329.
20. CALVO, P.; BARBA, J.; CABEZAS, J.A. *Clin. Chim. Acta*, 1982; 119: 15.

Pedidos de Separatas:

Cristina Pinto

Instituto de Quimica Fisiológica

Faculdade de Medicina de Lisboa

1600 Lisboa