

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE L-TIROSINA SOBRE  
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS JOVENS**

**Juliana Gonzalez Coelho**

**Porto Alegre, 2010.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE L-TIROSINA SOBRE  
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS JOVENS**

**Juliana Gonzalez Coelho**

Trabalho de Conclusão  
da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho  
Orientador

Tarsila Barros Moraes  
Co-orientadora

**Porto Alegre, 2010.**

Dedico esse trabalho aos meus pais  
Oscar e Leila, pelo amor, carinho e  
confiança depositados em mim. Sem  
eles essa conquista não seria possível.

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses quefazerem que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquisa para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquisa para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade ."

Paulo Freire

## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por sempre iluminar o meu caminho e me ajudar a realizar os meus sonhos.

Aos meus pais pela educação que me deram, a pessoa que sou hoje devo a eles. Muito obrigada por trilharem ao meu lado este longo caminho da faculdade, me apoiando, acreditando na minha capacidade e sempre com os braços abertos e com um sorriso no rosto para acolher minhas lágrimas e minhas dúvidas nos momentos difíceis. Obrigada pelas palavras que sempre confortaram o meu coração. Amo muito vocês.

A minha irmã e melhor amiga, Julise, pela amizade, cumplicidade e pelas horas de estudos ao meu lado. Uma das pessoas que mais amo no mundo e que sei que vai estar sempre ao meu lado.

Aos meus avós, Walter e Dora, sem a ajuda e o apoio deles, tudo teria sido mais difícil e obrigada por entenderem os motivos que me fizeram ficar mais ausente nos almoços de domingo.

Ao meu namorado, Eduardo, por entrar na minha vida num ano tão importante e abrilhantar os meus dias com sua presença, carinho, amor e paciência. Amor, obrigada pela ajuda e pelo apoio, tu fez com que tudo ficasse mais fácil e mais bonito. Te amo muito!

Ao Dutra, meu orientador e paizão do laboratório 36, pela paciência com minhas dúvidas e pela orientação neste trabalho.

As mestrandas Andréa, Carol M. e Priscila e aos bolsistas de iniciação científica do laboratório 36, Bruna, Carlitos, Gio, Marcelo e Melaine, obrigada pela amizade e pela ajuda, a participação de vocês neste trabalho foi fundamental.

A Carol P. e a Ângela, por se colocarem a minha disposição e esclarecerem as dúvidas que surgiram durante este trabalho.

Por último, mas com uma grande importância, a minha amiga, “chefa” e co-orientadora, Tarsila, pela disposição, boa vontade e pelas palavras de incentivo durante todo o trabalho. Com certeza, sem a tua participação, este trabalho não teria sido possível.

Este artigo foi elaborado segundo as normas do “Journal of Inherited Metabolic Disease”  
apresentadas em anexo.

EFFECT OF ACUTE ADMINISTRATION OF L-TYROSINE ON PARAMETERS OF  
OXIDATIVE STRESS IN LIVER OF YOUNG RATS

Juliana Coelho<sup>1</sup>, Tarsila Moraes<sup>2</sup> e Carlos Severo Dutra filho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica and* <sup>2</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:*  
*Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande*  
*do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil*

\* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Carlos Severo Dutra Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: +55 51 33085573

Fax number: +55 51 33085535

E-mail: dutra@ufrgs.br

\* Word count: 2.359

\* Number of figures: 5

## Resumo

A tirosinemia tipo I (HTI) é uma doença autossômica recessiva, causada pela deficiência da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (FAH), com incidência de 1:200.000 nascimentos, conhecida por ser a forma mais grave dentre as tirosinemias. O bloqueio da última enzima da rota metabólica da tirosina, a FAH, leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos como o maleilacetoacetato (MAA), fumarilacetoacetato (FAA) e succinilacetona (SA), os quais são responsáveis por problemas hepáticos e renais característico da doença. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito de um modelo agudo de HTI sob parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de fígados de ratos jovens. Ratos Wistar de 14 dias de idade (n=4-9) foram submetidos a uma administração aguda de L-tirosina (500mg/kg). Uma hora após a injeção, os ratos foram mortos por decapitação e o fígado foi retirado, homogeneizado em 10 volumes (1:10 p/v) e centrifugado a 800g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para medir o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e de carbonilas formadas e a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). A administração de L-tirosina aumentou significativamente a atividade da enzima GPx mas não foi capaz de alterar a atividade da CAT e da SOD e nem causou dano lipídico e nem dano protéico. Estes resultados são dados preliminares, mais estudos deverão ser realizados afim de melhor compreender o envolvimento da tirosina com o estresse oxidativo em pacientes HTI.

**Palavras Chaves:** Tirosinemia tipo I, L-tirosina, estresse oxidativo

**Contagem de palavras:** 237



## Abstract

Tyrosinemia type I (HTI) is an autosomal recessive disease caused by deficiency of the enzyme fumarylacetoacetate hydrolase (FAH), with an incidence of 1:200.000 newborns, known for being the most serious among tyrosinemia. The blocking of the last enzyme of the tyrosine metabolic pathway, the FAH leads to the accumulation of toxic metabolites such as maleylacetoacetate (MAA), fumarylacetoacetate (FAA) and succinylacetone (SA), which are responsible for liver and kidney problems characteristic of the disease. In the present study, we investigated the effect of an acute model of HTI under oxidative stress parameters in liver homogenates of young rats. Wistar rats of 14-day-old (n = 4-9) underwent an acute administration of L-tyrosine (500mg/kg). One hour after injection, rats were killed by decapitation and liver was removed, homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) and centrifuged at 800g for 10min at 4 ° C. The supernatant was used to measure the content of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and carbonyl content and the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The administration of L-tyrosine increased the enzyme activity of GPx but was unable to alter the activity of SOD and CAT and caused neither lipid damage and nor protein damage. These preliminary results are given before more studies should be conducted in order to better understand the involvement of tyrosine to oxidative stress in patients with HTI.

**Keywords:** Tyrosinemia type I, L-tyrosine and oxidative stress

**Word count:** 226

## 1. Introdução:

A tirosina é um aminoácido aromático que pode ser obtido a partir da hidrólise de proteínas da dieta ou do tecido ou através da hidroxilação da fenilalanina, sendo, portanto, um aminoácido semi-essencial (Held et al 2006; Sgaravatti et al 2009). Ela está diretamente envolvida na biossíntese de catecolaminas, melanina e hormônios da tireóide, além disso, tem dois destinos metabólicos principais: síntese protéica ou degradação em fumarato e acetoacetato (Sgaravatti et al 2008).

Dentro do citoplasma dos hepatócitos e do epitélio do túbulo proximal do rim, ocorre uma série de reações enzimáticas que são responsáveis pelo metabolismo da tirosina (Held et al 2006). De acordo com Scott et al (2006), a deficiência de alguma dessas enzimas leva à hipertirosinemia, devido ao acúmulo de tirosina nos tecidos, no líquido cérebro-espinhal, no sangue e na urina. Diferentes defeitos genéticos associados à elevada concentração desse aminoácido foram identificados e classificados em quatro sub-tipos de tirosinemia: tipo I, tipo II, tipo III e alcaptonúria. A tirosinemia tipo I é causada pela deficiência da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (FAH); a tipo II por uma deficiência da tirosina aminotransferase (TAT); a tipo III, uma desordem extremamente rara, devido à deficiência da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4HPPD) e a alcaptonúria onde ocorre deficiência da homogentizato 1,2-dioxigenase.

A tirosinemia tipo I (HTI), é uma doença autossômica recessiva com incidência de 1:200.000 nascimentos, conhecida por ser a forma mais grave dentre as tirosinemias. O bloqueio da última enzima da rota metabólica da tirosina, a FAH, leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos como o maleilacetoacetato (MAA), fumarilacetoacetato (FAA) e succinilacetona (SA), os quais são responsáveis por problemas hepáticos e renais característico da doença (Held et al 2006; Masurel-Paulet et al 2008). Relatos mostram que a concentração de tirosina varia de 50 a 120 mol/L (Pass e Morrissey 2008). Os problemas hepáticos relatados são desde insuficiência hepática, cirrose micronodular até carcinoma hepatocelular, desenvolvido na forma mais avançada da doença. Entre as lesões renais, estão descritas, a Síndrome de Fanconi e tubulopatia com raquitismo secundário (Masurel-Paulet et al 2008). Scott et al (2006) relata que a fase inicial da doença pode progredir para necrose hepática, icterícia, ascite e hemorragia gastrointestinal. Nos primeiros meses de

vida, na forma aguda, os pacientes apresentam falha no fígado e se não for tratada, leva à morte. Na forma crônica, esses pacientes tem maior problema renal, caracterizado por uma aminoacidúria generalizada, perda de fosfato e acidose renal tubular (Scott et al 2006). Esses pacientes são geralmente diagnosticados no início da infância com sintomas de hepatomegalia, cirrose hepática, raquitismo hipofosfatêmico ou a combinação desses sintomas, além disso, podem ter crises neurológicas (Held et al 2006).

O diagnóstico desses pacientes é feito através da análise de ácidos orgânicos na urina, onde os ácidos 4-hidroxifenilpirúvico, 4-hidroxifenilático e 4-hidroxifenilacético encontram-se aumentados (Endo e Sun 2002). Há relatos que a urina apresenta um cheiro de “repolho cozido” ou “cogumelo podre”, essa característica associada a uma elevada concentração de uma  $\alpha$ -fetoproteína no soro, ajuda na identificação da tirosinemia tipo I. Além disso, ocorre um aumento na concentração de metionina e tirosina no plasma e acúmulo de succinilacetoacetato e succinilacetoacetona na urina e no plasma, sendo esta última considerada o principal indicador para o diagnóstico da doença (Scott et al 2006; Held et al 2006). O teste confirmatório é feito através da medida da enzima FAH em cultura de fibroblastos de pele ou através da análise de mutação de DNA (Scott et al 2006).

Os pacientes HTI recebem uma dieta restrita em tirosina e fenilalanina para evitar o acúmulo do metabólito tóxico FAA, porém essa restrição não impede totalmente a disfunção hepática e renal (Langlois et al 2006; Langlois et al 2008). Em 1991, a 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoi)-1,3-cicloexanodiona (NTBC) foi introduzida no tratamento desses pacientes para prevenir esse acúmulo nas células do fígado e do rim. O NTBC bloqueia a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, segunda enzima da via metabólica da tirosina, suprimindo o acúmulo dos metabólitos MAA, FAA e SA, mas não impedindo o de tirosina (Lindsedt et al 1992; Luijterink et al 2003; Masurel-Paulet et al 2008). Embora haja uma melhora nos sintomas, essa droga não é capaz de impedir o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Luijterink et al 2003; Langlois et al 2006). Nesses casos, a única terapia efetiva é o transplante de fígado, embora ainda se encontre baixos níveis de SA, que é atribuído a contínua produção renal (Scott et al 2006). Essa droga também tem sido testada em ratos knockout-FAH para que não ocorra a morte neonatal, mas 50% dos ratos desenvolveram hepatocarcinoma (Langlois et al 2006).

Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia de doenças do metabolismo, dentre elas, a tirosinemia (Sgaravatti et al 2008), onde ocorre acúmulo de ácidos orgânicos tóxicos, os quais se supõem serem responsáveis pela produção excessiva de espécies reativas (Wajner et al 2004). A administração de FAA e MAA pode diminuir os níveis de glutathione (GSH), importante antioxidante celular, sugerindo o envolvimento de espécies reativas na HTI (Bird et al 1995). Além disso, Sgaravatti et al (2008) mostrou que a incubação de L-tirosina em tecido cerebral alterou diversos parâmetros de estresse oxidativo, como o potencial antioxidante total, conteúdo de tióis e de ácido ascórbico, dano ao DNA e atividade da catalase. E estudos com um modelo agudo de tirosinemia mostraram que o modelo da doença aumentou a lipoperoxidação, o conteúdo de carbonilas protéicas e atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, e diminuiu o conteúdo de tióis e de GSH no sistema nervoso (Sgaravatti et al 2009).

Considerando a difícil identificação precoce da doença e que o estresse oxidativo tem sido estudado em diversas doenças, inclusive em distúrbios metabólicos (Sgaravatti et al 2008), o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito de um modelo agudo de HTI sob parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizados de fígados de ratos jovens, afim de melhor compreender a participação da tirosina no dano hepático observado em pacientes hipertirosinêmicos.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Reagentes e equipamentos*

Todos os reagentes foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Um espectrofotômetro de feixe duplo com controle de temperatura (M5), um espectrofluorímetro SpectraMax Gemini XPS e um cintilador Wallac 1409 foram utilizados para a medição. Eppendorf 5417R e 5403 foram usados para processos de centrifugação.

### *2.2. Animais e preparação do tecido*

Ratos Wistar de 14 dias de vida foram obtidos junto ao Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Um modelo agudo de hipertirosinemia foi induzido quimicamente administrando, pela via subcutânea, L-tirosina metil éster que foi dissolvida em 0,1% de Tween 20 em solução salina (pH ajustado para 7,4) e com dose equivalente a 500mg/Kg de peso corporal (Sgaravatti et al., 2009). Os grupos Controle receberam 0,1% de Tween 20 dissolvido em solução salina. Uma hora após a injeção, os ratos foram mortos por decapitação sem anestesia e o fígado foi retirado imediatamente e mantido no gelo. O fígado foi pesado e homogeneizado em 10 volumes (1:10 p/v) no tampão fosfato de sódio 20mM com KCl 140mM pH 7,4. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 800g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi separado e utilizado para as medições.

### 2.3. *Catalase*

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984) utilizando um espectrofotômetro. Este método é baseado na diminuição da absorbância de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240nm em um meio de reação contendo 20mM de  $H_2O_2$  e 10mM tampão fosfato de potássio pH 7.0. As amostras foram incubadas previamente por 15 minutos no gelo com 0,1% Triton X-100. Uma unidade de CAT é definida como 1 $\mu$ mol de  $H_2O_2$  consumido por minuto e a atividade específica é calculada em unidades de CAT/mg de proteína.

### 2.4. *Superóxido dismutase*

A atividade da SOD foi realizada como a descrita por Marklund (1985). Este método baseia-se na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de radical superóxido. A inibição da auto-oxidação deste composto ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente analisada espectrofotometricamente a 420nm. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto-oxidação pirogalol é definida como

uma unidade de SOD e a atividade específica é representada em unidades por mg de proteína.

### *2.5. Glutathione peroxidase*

A atividade de GPx foi medida de acordo com o método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de terc-butil como substrato. O consumo de NADPH foi monitorado a 340nm usando um espectrofotômetro. O meio de reação continha 2mM glutathione, 0,10U/mL glutathione reductase, 0,4mM azida, 0,5mM hidroperóxido de terc-butil e 0,1mM de NADPH. Uma unidade GPx é definida como 1 $\mu$ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é representada por unidades de GPx/mg de proteína.

### *2.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*

O TBA foi medido de acordo com o método de Ohkawa et al (1979). Os radicais livres reagem com lipídeos de membrana causando lipoperoxidação, com conseqüente formação principalmente de malondialdeído. Esta substância aquecida, em presença de ácido tiobarbitúrico, forma um composto corado que é medido espectrofotometricamente em 532nm. Os resultados são expressos nmol TBA-RS/mg de proteínas.

### *2.7. Carbonilas*

A medida do conteúdo de carbonilas foi realizada por um método baseado na reação de carbonilas com dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando dinitrofenilidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370nm (Reznick e Packer, 1994). O conteúdo de carbonilas e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

### *2.8. Proteínas*

A concentração de proteínas foi determinada através do método de Lowry (1951), usando padrão de albumina bovina.

## 2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student não-pareado. Todas as análises foram realizadas utilizando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), em um computador PC-compatível.

## 3. Resultados:

Neste trabalho, foi investigado o efeito da administração aguda de L-tirosina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratos de 14 dias. A figura 1 apresenta a atividade da enzima antioxidante GPx no modelo de ratos hipertirosinêmicos, onde pode-se ver que a enzima GPx encontra-se significativamente aumentada em relação ao controle [t(8)= -2,61;  $p < 0,05$ ]. Na figura 2 encontram-se os resultados das atividades das enzimas CAT e SOD que não tiveram suas atividades alteradas, SOD [t(12)= 1,88;  $p > 0,05$ ] e a CAT [t(6)= -2,298;  $p > 0,05$ ], embora a CAT tenha uma tendência a aumentar sua atividade ( $p = 0,06$ ).

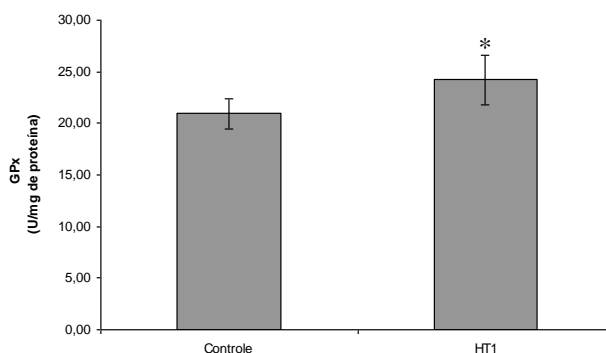


Fig. 1: Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade da glutathione peroxidase (GPx) em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle (teste t de Student).

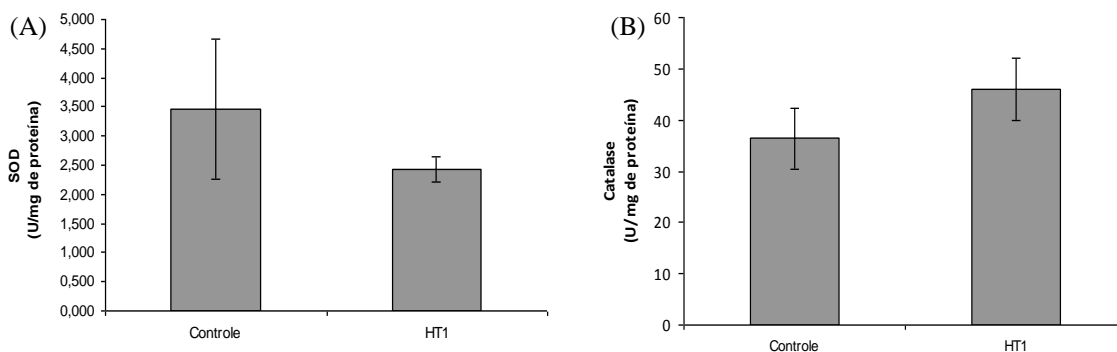


Fig. 2: Efeito da administração aguda de L-tirosina na atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n= 4-9). Não foi detectada diferença significativa pelo teste t de Student.

O dano lipídico também foi medido através da técnica do TBA-RS [t(9)= 0,307;  $p>0,05$ ], mostrado na figura 3, no entanto, não foi possível observar o efeito da administração de 500mg/kg de L-tirosina neste parâmetro. Outro parâmetro analisado, foi o de conteúdo de carbonilas [t(8)= -0,199 ;  $p>0,05$ ] onde também não foi possível observar o dano protéico.

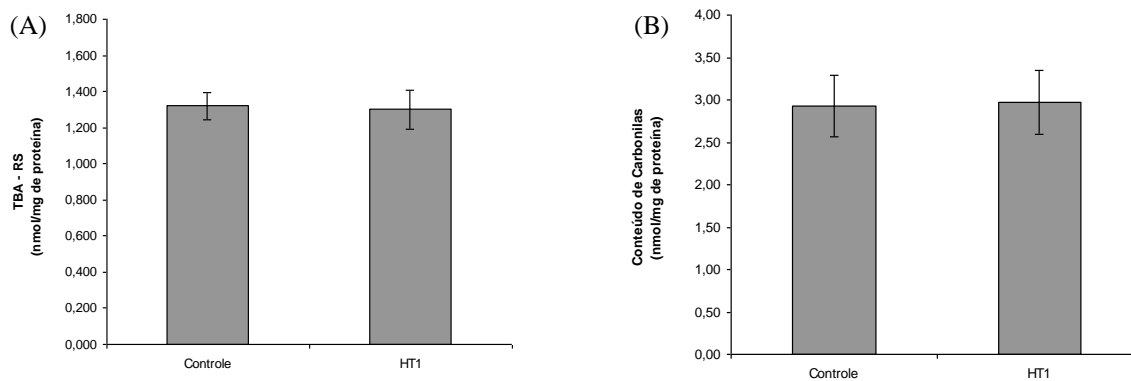


Fig. 3: Efeito da administração aguda de L-tirosina na peroxidação lipídica (TBA-RS) (A) e no conteúdo de carbonilas protéicas (B) em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n= 4-6). Não foi detectada diferença significativa pelo teste t de Student.



#### **4. Discussão:**

Erros inatos do catabolismo de tirosina levam a um aumento na concentração deste aminoácido nos tecidos, no fluido cérebro-espinhal, no sangue e na urina dos pacientes com deficiência da enzima FAH (Scott et al 2006). Embora os sintomas deste distúrbio estejam bem descritos, os mecanismos fisiopatológicos causados pela deficiência da FAH no fígado são amplamente desconhecidos. No presente trabalho, o efeito da administração aguda de L-tirosina foi investigado em homogeneizados de fígado de ratos Wistar de 14 dias, visando elucidar o envolvimento deste aminoácido com o estresse oxidativo, já que as informações disponíveis são muito limitadas.

Devido a administração de L-tirosina, um aumento significativo da atividade da GPx foi observada através de sua medição no fígado. A GPx é uma enzima capaz de remover peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (Halliwell e Gutteridge 1985), através da oxidação da glutathione reduzida. O resultado obtido sugere que a tirosina foi capaz de induzir uma maior produção de espécies reativas derivadas de peróxido de hidrogênio, aumentando a atividade da GPx afim de remover as espécies reativas produzidas. Como o fígado é um órgão de detoxificação, ele tem um alto nível de fator de transcrição Nrf2 (Lewis et al 2010). Este fator de transcrição, tem entre seus papéis importantes, a indução de antioxidantes como GSH, co-fator da GPx, fazendo parte da via de citoproteção contra o estresse oxidativo e além disso, desempenha um papel importante na proteção contra o câncer de fígado em pacientes de HTI sob tratamento com NTBC (Marhenke et al 2008).

Este resultado é reforçado pela tendência da CAT em ter sua atividade aumentada, pois esta enzima também tem a função de metabolizar o peróxido de hidrogênio. No entanto, neste modelo de HTI não houve alteração da atividade da CAT. Outro parâmetro enzimático analisado foi a atividade da SOD, que tem como função a dismutação do radical superóxido (Halliwell e Gutteridge 1985), mas também não teve sua atividade alterada pela administração da L-tirosina. Este resultado corrobora o encontrado em córtex cerebral de ratos realizado anteriormente em nosso laboratório (Sgaravatti et al 2008 e 2009).

Sgaravatti et al (2009) mostrou que o modelo agudo de tirosinemia aumentou tanto a lipoperoxidação quanto o conteúdo de carbonilas protéicas em córtex cerebral de ratos

juvencos. Em nossas condições experimentais, os níveis de TBA-RS não foram alterados, sugerindo que L-tirosina não induz o dano oxidativo aos lipídios em homogeneizados de fígado. O acúmulo de L-tirosina no fígado também não foi capaz de alterar o conteúdo de carbonilas, um parâmetro de dano oxidativo a proteínas, mostrando que estas podem ser preservadas contra a degradação de proteínas oxidadas e/ou contra a modificação oxidativa dessas proteínas. Porém, o órgão estudado, o fígado, possui altos níveis de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tornando-o menos susceptível a danos gerados oxidativamente.

Uma possível explicação para os resultados obtidos nas técnicas de CAT, SOD, TBA e Carbonilas se dá pelo modelo da doença utilizado. Em nosso modelo, não foi usado o inibidor da enzima FAH e sim, administrado uma alta dose de tirosina para que ocorresse o acúmulo deste aminoácido, então, embora os níveis de tirosina estejam aumentados, como de fato ocorre na doença, não houve um bloqueio da rota de metabolização da tirosina, desta forma, existe uma diferença entre os níveis dos metabólitos da doença e do nosso modelo de HTI.

Neste trabalho, não foi possível elucidar o envolvimento da tirosina com o estresse oxidativo em fígado de ratos no modelo HTI proposto. No entanto, os dados apresentados são resultados preliminares, onde o tamanho amostral será aumentado e serão realizadas mais técnicas, a fim de melhor compreender a participação deste aminoácido no dano hepático observado nos pacientes HTI.

## **5. Bibliografia:**

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105: 121-126.

Bird S, Miller N, Collins J, Rice-Evans C (1995) Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC. *J Inher Metab Dis* 18: 123-126.

Colomé C, Sierra C, Vilaseca MA (2000) Errores congénitos del metabolismo: causa de estrés oxidativo? *Med Clin* 115: 111-117.

Endo F, Sun M (2002) Tyrosinaemia type I and apoptosis of hepatocytes and renal tubular cells. *J Inher Metab Dis* 25: 227-234.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy SF, Lissi E (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388: 261-266.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 8:22-26.

Held PK (2006) Disorders of tyrosine catabolism. *Mol Genet Metab* 88: 103-106.

Langlois C, Jorquera R, Finegold M, Shroads A, Stacpoole P, Tanguay R (2006) *biochemical pharmacology* 71: 1648-1661.

Langlois C, Jorquera R, Orejuela et al (2008) Rescue from neonatal death in the murine model of hereditary tyrosinemia by glutathione monoethylester and vitamin C treatment. *Mol Genet and Metabol* 93: 306-313.

Lewis K, Mele J, Hayes J, Buffenstein R (2010) Nrf2, a Guardian of Healthspan and Gatekeeper of Species Longevity. *Integr Comp Biol* 50(5): 829-843

Lindstedt S, Holme E, Lock E, Hjalmarsen O, Strandvik B (1992) Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *The lancet* 340: 813-817.

Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17: 299-311.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18: 153-158.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Luijckx M, Jacobs S, Beurden E et al (2003) Extensive changes in liver gene expression induced by Hereditary Tyrosinemia type I are not normalized by treatment with 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3 cyclohexanedione (NTBC). *Journal of Hepatology* 39: 901–909.

Marhenke S, Lamlé J, Buitrago-Molina LE et al (2008) Activation of nuclear factor E2-related factor 2 in hereditary tyrosinemia type 1 and its role in survival and tumor development. *Hepatology* 48(2): 487- 96.

Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In Greenwald RA, ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press, 243-247.

Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland M et al (2008) NTBC treatment in tyrosinaemia type I: Long-term outcome in French patients. *J Inherit Metab Dis* 31:81-87.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.

Pass K, Morrissey M (2008) Enhancing newborn screening for tyrosinemia type I. *Clinical Chemistry* 54: 627-629.

Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods enzymol* 233: 357-363.

Scott CR (2006) The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142: 121-126.

Sgaravatti A, Vargas B, Zandoná B et al (2008) Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 26: 551-559.

Sgaravatti A, Magnusson A, Oliveira A et al (2009) Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis* 24: 415–425.

Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inherit Metabol Dis* 27: 427-448.

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-332.

# **ANEXO**



# **JIMD – Journal of Inherited Metabolic Disease**

## **Aims and Scope**

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

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

## **Scientific contributions**

## ***Full Articles***

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

- **Original Articles:** Important manuscripts that may be expected to influence or change clinical or research practice with regard to inherited metabolic disorders. Original articles may include comprehensive studies on disease features in groups of patients, important novel information on a disease or relevant research findings. Exceptional case reports that are judged to be of general interest to the readers may also be accepted as original articles. The editors may reject submitted manuscripts as original articles but invite revision or resubmission for publication as Reports in “JIMD Reports”. Anecdotal observations may also be submitted as “Extras”.
- **Rapid Communications:** Highly competitive and timely manuscripts; please discuss this with the editors: editor@jimd.org.
- **Reviews:** Concise summaries of metabolic pathways, specific disorders, methods, treatment options etc.
- **Metabolic Dissertations:** The JIMD invites all researchers who have completed a Ph.D. or M.D. thesis in the field of inborn errors of metabolism to submit a comprehensive review of the topic of their thesis. The article should not focus solely on the research findings but should cover all relevant information in the respective field. Such reviews preferably (but not necessarily) have a single author (other contributors should be acknowledged) and will be published with a photograph of the investigator.

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

## ***Images in Metabolic Medicine***

The Editors will consider clear and interesting clinical pictures or other types of images (e.g. laboratory results or observations) submitted with a descriptive paragraph of up to 250 words. Prints, slides, or electronic copy are all acceptable. Authors must obtain informed

consent for publication of patient-related materials. Case reports or additional information may be added as supplementary material. Images will be fully printed; title and author(s) will be listed in bibliographical databases such as Medline.

### ***Editorials***

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

### ***Letters***

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

Letters should have no more than five authors. They have no abstract, are limited to a maximum of 500 words and should contain no more than two (if any) references. Additional material can be added as supplementary material online. Letters will be fully printed; title and author(s) will be listed in bibliographical databases such as Medline.

### ***Reports (Online Articles)***

Some manuscripts present scientifically sound research findings or clinical observations that are worth communicating but are of more limited interest to the readers of JIMD and may be sufficiently summarised in an abstract of 250 words. In order to facilitate publication of these types of manuscripts, “**JIMD Reports**” has been introduced as a sister of the traditional “JIMD”. It is positioned as an independent periodical with its own ISSN

number. All manuscripts submitted as Reports to the JIMD website will be considered for “JIMD Reports” rather than for the traditional journal. They will undergo the same review process as Original Articles (and in exceptional cases may be reassigned for publication in the traditional “JIMD”). In addition, the Editorial Team (based on the advice of reviewers and Communicating Editors) may reject Original Articles for publication in the traditional “JIMD” but offer publication in “JIMD Reports”. After acceptance, articles in “JIMD Reports” will be professionally typeset in the same manner as articles in “JIMD”. Reports will be available online and fully referenced in bibliographical databases. They will be submitted to relevant international abstracting and indexing services with an embargo of no more than 12 months and thus (in contrast to traditional “JIMD” articles) will be available free of charge after a certain time period. In addition, titles and abstracts of Reports are printed in the print-only “Extras” section of the traditional “JIMD”. It is recommended to use of the full allowance of 250 words for the abstract of Reports to convey the message of the article to the widest possible readership.

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

## **Extras in the JIMD**

The Editors of the JIMD invite submission of short items that are interesting, stimulating, important or entertaining to professionals working in the field of inborn errors of metabolism. These items will not usually be reviewed outside the editorial board and usually will not be referenced in bibliographic databases. All items of this type should be

submitted by Email to the editorial office (editor@jimd.org); please provide full personal details for all authors of each contribution.

### ***Observations and opinions***

The JIMD wishes to provide a forum for relevant or stimulating opinions, ideas, experiences or personal views that merit communication without fulfilling the requirements for scientific articles or short reports. Items in this section may include anecdotal experiences that are deemed important to others in the field, unusual clinical observations, puzzling complications or novel side effects, or summaries of contributions e.g. to the metabolic Email list metab-1.

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

### ***Fillers***

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

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

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

## ***Book Reviews***

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

## ***Obituaries***

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

Please provide:

1. The full **name** of the deceased
2. A (black and white) photograph
3. A summary of **Important data:**
  - a. *Professional position/title, place of work*
  - b. *Date and place of birth*
  - c. *Primary degree with university and year when obtained*
  - d. *Additional professional qualifications with university and year when obtained*
  - e. *Date of death, Cause of death*
4. The **main text** summarising important contributions and personal characteristics of the deceased. The last sentence should state the remaining relatives such as spouse and/or the number of children and grandchildren.

## **Instructions for submission**

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

### ***Online Submission***

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

[www.editorialmanager.com/boli](http://www.editorialmanager.com/boli)

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

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

### ***General rules***

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

- absence of previous similar or simultaneous publications,

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

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

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

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

- *Details of the contributions of individual authors*, making clear who has contributed pertinent aspects of the planning, conduct, and reporting of the work described in the article.
- *Name of one author who serves as guarantor* for the article, accepts full responsibility for the work and/or the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.
- *A competing interest statement*, i.e., either a statement describing the interests of all authors or a declaration that they have nothing to declare, based on the “Competing Interests Questions” outlined below.
- *Details of funding* for all research studies including a statement that “The author(s) confirm(s) independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors”
- *Details of ethics approval* or a statement that it was not required for all research studies



- *A patient consent statement* for all articles or other material that contain personal information about a patient; proof that informed consent was obtained must be available upon request
- If vertebrate animals have been utilized, documentation of *approval from the Institutional Committee for Care and Use of Laboratory Animals* (or comparable committee).

### ***Competing Interests***

Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationships that inappropriately influence (bias) his or her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). These relationships vary from those with negligible potential to those with great potential to influence judgment, and not all relationships represent true conflict of interest. The potential for conflict of interest can exist whether or not an individual believes that the relationship affects his or her scientific judgment. Financial relationships (such as employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony) are the most easily identifiable conflicts of interest and the most likely to undermine the credibility of the journal, the authors, and of science itself. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships, academic competition, and intellectual passion.

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

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

- Reimbursement for attending a symposium?
- A fee for speaking or for organising education?

- Funds for research or for a member of staff?
  - A fee for consulting?
2. Have you in the past five years been employed by an organisation that may in any way gain or lose financially from the results of your study or the conclusions of your review, editorial, or letter? Do you hold any stocks or shares in such an organisation?
3. Have you acted as an expert witness on the subject of your study, review, editorial, or letter?
4. Do you have any other competing financial interests?

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

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

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

Expert reviewers approached for assessment of submitted articles are also requested to declare conflicts of interest that may impede on their judgement of that article.

This specifically includes competing research in the same area that could be negatively affected by publication of the submitted article.

For additional information see also “uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” at [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

### ***Manuscript structure***

The first page should include:

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

The second page should include

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

### ***Units, symbols, database references***

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

- Inherited diseases to the OMIM catalogue number  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)
- Enzymes to an Enzyme Commission (EC) number

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)

- Genes to the HUGO-approved gene symbol  
(<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>)

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

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

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

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

## ***References***

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

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

*Journals:*

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

*Chapter in an edited book:*

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

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

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

***Research materials***

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

### *After acceptance of a manuscript*

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

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

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

### *Springer Open Choice*

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular

subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. See also: [www.springeronline.com/openchoice](http://www.springeronline.com/openchoice)

### **Additional Information**

Additional information can be obtained from:

Dr. Verena Peters  
Managing Editor, Journal of Inherited Metabolic Disease  
University Children's Hospital  
Im Neuenheimer Feld 150  
69120 Heidelberg  
Germany  
Tel: +49 (6221) 5631715  
Fax: +49 (6221) 565565  
Email: [Verena.Peters@med.uni-heidelberg.de](mailto:Verena.Peters@med.uni-heidelberg.de)

Dr. Andrea Pillmann  
Senior Editor, Biomedicine  
Springer  
Tiergartenstr. 17  
69121 Heidelberg  
Germany  
Tel: +49 6221 487 8346  
Fax: +49 6221 487 6 8346  
Email: [andrea.pillmann@springer.com](mailto:andrea.pillmann@springer.com)