

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica: Perfil clínico e bioquímico de casos diagnosticados no Brasil nos últimos 24 anos

Aline Kayser

Porto Alegre, junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Acidúria 3-Hidroxi-3-Metilglutárica: Perfil clínico e bioquímico de casos diagnosticados no
Brasil nos últimos 24 anos

Aline Kayser

Orientadora: Prof. Dr. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, junho de 2018

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista “Clinical and Biomedical Research” (CBR) na qualidade de “Artigo Original” apresentadas em anexo (Anexo 2).

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha família pelo apoio e pelo sustento durante a graduação, sem os quais não seria possível concluir o curso. Aos meus amigos da faculdade, em especial a minha melhor amiga Grazi que esta comigo desde o dia do DAFF me leva, que falicitaram o dia a dia com a conversa e a companhia além da ajuda nos estudos.

Agradeço também ao meu irmão que nesse ultimo ano teve que ter um pouco mais de paciência comigo e acabou cedendo a todas as minhas manias, e ao meu namorado, que nos últimos tempos tem sido a pessoa que mais me apoiou e ajudou.

Agradeço as bioquímicas, Dani e Angela, que além da companhia e da compreensão me ensinaram muitos nesses 2 anos como iniciação científica do laboratório.

E por fim agradeço a minha orientadora, Carmen Regla Vargas, que me colocou nesse mundo dos erros inatos e fez com que a matéria perdida e meio sem contexto que aprendemos na bioquímica básica no curso de farmácia tivesse uma aplicação mais clara do seu impacto na vida dos pacientes. Se em algum dia eu conseguir ser tão boa profissional quanto ela e a Angela, saberei que atinge o sucesso que almejo como farmacêutica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVO.....	10
METODOLOGIA.....	10
Coleta de dados.....	10
Pacientes e amostras biológicas.....	11
Análise por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas.....	11
Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas.....	11
Análise molecular.....	12
Dosagem da creatinina.....	12
RESULTADOS.....	12
Diagnóstico.....	12
Histórico familiar e origens.....	12
Manifestações clínicas e alterações laboratoriais.....	13
Análise molecular.....	13
Uso de medicamentos e dietas.....	13
DISCUSSÃO.....	14
REFERÊNCIAS.....	16
ANEXOS.....	19
Anexo 1: Tabelas e Figuras.....	19
Anexo 2: Normas da revista.....	25

RESUMO

Introdução: A acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica é uma doença genética autossômica recessiva e um erro inato do metabolismo em que se tem a deficiência na enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liase, que é uma enzima fundamental no metabolismo da leucina e na produção de corpos cetônicos. **Objetivo:** Coletar e analisar dados de 1994 até os dias atuais de todos os pacientes diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com a doença. **Métodos:** Análise de ácidos orgânicos na urina foi realizada por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e de acilcarnitinas no sangue por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas. A análise molecular foi feita pelo método de Southern blot seguida de PCR. Estes pacientes são de diversos estados brasileiros e seu diagnóstico é tardio. **Resultados:** Os principais metabólitos encontrados na urina por cromatografia gasosa foram os ácidos orgânicos 3-hidroxi-3-metilglutárico, 3-metilglutacônico, 3-metilglutárico e 3-hidroxi-isovalérico. Na análise de acilcarnitinas em sangue impregnado em papel filtro por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas foi detectado o aumento da acilcarnitina 3-hidroxi-isovalerilcarnitina e da razão 3-hidroxi-isovalerilcarnitina/ carnitina principalmente. Os resultados da análise molecular mostraram a mutação E37X como a principal. Os sintomas clínicos foram em grande maioria neurológicos como convulsões ou de recusa alimentar como vômitos. A análise laboratorial revelou hipoglicemia e acidose metabólica na maioria dos casos. Como o diagnóstico foi tardio, muitos destes pacientes já faziam algum tratamento medicamentoso e dietético. **Conclusão:** Cabe salientar a importância do diagnóstico desta acidemia orgânica, ainda que tardio, prevenindo o óbito e possibilitando instituição terapêutica.

PALAVRAS CHAVES

Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liase, acidúrias orgânicas, hipoglicemias, convulsões.

ABSTRACT

Introduction: 3-hydroxy-3-methylglutaric acidemia is an autosomal recessive genetic disorder and an inborn error of metabolism in which there is a deficiency in the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase, which is a key enzyme in metabolism of leucine and in the production of ketone bodies. **Objective:** To collect and to analyze data from 1994 to the present day of all patients diagnosed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre with the disease. **Methods:** Analysis performed by gas chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometer of organic acids in urine and acylcarnitines in blood by liquid chromatography coupled to mass spectrometer. Molecular analysis was done by the Southern blot method followed by PCR. These patients are from several Brazilian states and their diagnosis is late. **Results:** The major metabolites found in urine by gas chromatography were organic acids 3-hydroxy-3-methylglutaric, 3-methylglutaconic, 3-methylglutaric and 3-hydroxyisovaleric. In the analysis of acylcarnitines in blood impregnated on filter paper by liquid chromatography coupled to mass spectrometer, the increase of the acylcarnitine 3-hydroxy-isovalerylcarnitine and the 3-hydroxy-isovalerylcarnitine / carnitine ratio were mainly

detected. The results of the molecular analysis showed the E37X mutation as the main one. Clinical symptoms were largely neurological such as seizures or refusal to feed like vomiting. Laboratory analysis revealed hypoglycemia and metabolic acidosis in most cases. As the diagnosis was late, many of these patients already had some drug and dietary treatment. **Conclusion:** It is necessary to emphasize the importance of the diagnosis this organic acidemia, even if late, preventing death and making possible a therapeutic institution.

KEYWORDS

3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase, organic acidurias, hypoglycemia, seizures.

LISTA DE ABREVIATURAS

C5OH3 - hidroxí-isovalerilcarnitina

HMG-CoA - liase 3-hidroxí-3-metilglutaril CoA liase

HMG - Acidemia 3-hidroxí-3-metilglutárica

C6DC - Adipilcarnitina

C0 - Carnitina livre

CG - Cromatografia gasosa

CG/MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

LC/MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

C5OH/C2 - Razão 3-hidroxí-isovalerilcarnitina/carnitina

INTRODUÇÃO

A acidemia ou acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica (HMG) é um erro inato do metabolismo, uma acidemia orgânica, sendo causada pela deficiência em uma enzima mitocondrial, a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liase (HMG-CoA liase)^{1,2}. Esta enzima é essencial em dois importantes processos bioquímicos: no catabolismo do aminoácido leucina, sendo a etapa final da via, e na produção de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos^{2,3}.

Esta doença possui herança autossômica recessiva sendo considerada rara^{4,5,6}, com uma prevalência de menos de 1/100.000 nascidos vivos⁶. Atualmente cerca de 180 casos foram descritos na literatura desde seu descobrimento em 1976 por Faull et al^{4,6,7,8,9,10,11,12,13}. A grande maioria destes casos é de pacientes de origem portuguesa ou árabe^{4,6,7,8,9,10,11,12}, sendo uma consequência da grande consanguinidade na população árabe⁷. Também foram descritos 5 casos desta doença no Japão¹³.

Os pacientes, em geral, apresentam os primeiros sintomas ainda no período neonatal ou até o primeiro ano de vida, porém a grande maioria destes sintomas não é específico para a doença, o que muitas vezes acaba por atrasar o diagnóstico ou até mesmo impedir que ele ocorra^{3,4,5,11,12,14}. Os principais sintomas clínicos são neurológicos, uma vez que os principais metabólitos acumulados na doença possuem potencial neurotóxico. Os mais comuns são vômitos e convulsões^{4,5,6,7,8,11}, que podem evoluir para coma, sendo decorrentes da baixa de glicose sanguínea e da falta de nutrientes para o tecido cerebral. Comumente estes sintomas estão associados a achados laboratoriais como hipoglicemia, acidose metabólica, hiperamonemia e cetonúria.

O tratamento preconizado atualmente consiste em uma dieta hipoproteica ou na restrição do aminoácido leucina associado a uma suplementação com L- carnitina^{2,4,15}. A L- carnitina se faz necessária devido a diminuição dos níveis de carnitina plasmática, que tem como função, na doença, a eliminação dos metabólitos tóxicos a partir da sua complexação e formação de outros metabólitos que são menos tóxicos, o que leva a uma deficiência secundária de carnitina livre nos pacientes^{16,17}.

O fato da deficiência enzimática ocorrer em um ponto da produção de corpos cetônicos faz com que a doença tenha um envolvimento neurológico maior na infância e fase neonatal, pois nesta idade os corpos cetônicos são tão utilizados quanto a glicose pelo cérebro^{18,19}. Como medida preventiva o paciente deve evitar o jejum prolongado, buscando manter uma dieta em que se alimente a cada 3 horas. Nas crises hipoglicêmicas se faz a administração de glicose e, se necessário, associação a bicarbonato de sódio para restaurar os valores de pH^{2,4,20}.

O diagnóstico no Brasil é feito pela análise de ácidos orgânicos na urina dos pacientes sintomáticos⁸, uma vez que essa doença não faz parte ainda do painel de triagem neonatal no nosso país. Faz-se a análise urinária de ácidos orgânicos utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massas (CG/CG-MS), sendo estes essencialmente oriundos do metabolismo da leucina^{21,22,23,24,25}. O perfil de acilcarnitinas em sangue impregnado em papel filtro utilizando a espectrômetro de massas (LC/MS/MS) é realizado para a triagem da doença, fazendo parte da triagem neonatal em países desenvolvidos^{26,27}.

O perfil de ácidos orgânicos na acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica foi descrito a primeira vez por Faull *et al*; em 1976²¹ e consiste principalmente na presença e no aumento urinário dos níveis de quatro ácidos orgânicos (ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, 3-metilglutárico, 3-metilglutacônico e 3-hidroxi-isovalérico), podendo ser detectado em um número menor de pacientes a presença da 3-metil-crotonilglicina^{11,21,22,23,24,25}. O perfil das acilcarnitinas no sangue total mostra aumento nos níveis de algumas acilcarnitinas, sendo as principais 3-hidroxi-isovalerilcarnitina (C5OH), a razão 3-hidroxi-isovalerilcarnitina/acetilcarnitina (C5OH/C2), adipilcarnitina (C6DC), bem como uma diminuição nos valores de carnitina livre (C0)^{26,27}.

O diagnóstico confirmatório desta patologia pode ser feito pela medida da atividade intracelular enzimática deficiente ou por biologia molecular⁶. O gene responsável pela enzima deficiente, a HMG-CoA liase, se localiza entre as posições p35 e p36 do cromossomo 1 e diversos tipos de mutações nesta região são causadoras da deficiência enzimática e consequentemente da acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica^{6,28}.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo descrever os casos de acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica que foram diagnosticados pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), estabelecendo um perfil de alterações clínicas e bioquímicas encontradas nestes pacientes em seus diagnósticos, no período de 1994 até 2017.

METODOLOGIA

As análises de cromatografia gasosa, cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas foram realizadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que é um centro de referência no diagnóstico de doenças genéticas no Brasil. Os dados clínicos dos pacientes foram retirados das suas respectivas fichas que ficam armazenadas em um banco de dados existente no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Nº 13-0284, sendo este consentimento para todas as investigações e análises realizadas.

Coleta de dados

Os dados clínicos dos pacientes diagnosticados com a HMG foram retirados das fichas prontuárias destes pacientes. Estes dados são enviados, geralmente, em conjunto com a amostra na qual será feita a investigação da doença. Os dados clínicos e os resultados de todos os exames realizados pelo Serviço de Genética Médica ficam descritos nas fichas de cada paciente e então são arquivados. Este estudo utilizou dados de todos os pacientes que tiveram o diagnóstico de HMG realizado pelo Serviço de Genética Médica, nenhum paciente foi excluído. Sendo este trabalho um estudo descritivo, transversal e retrospectivo.

Pacientes e amostras biológicas

O estudo foi realizado utilizando a urina de pacientes sintomáticos em crise metabólica e sangue impregnado em papel filtro. Estes pacientes tiveram seus exames encaminhados para o Hospital de Clínicas de Porto Alegre após suspeita clínica nos seus estados de origem, sendo assim as amostras destes pacientes são provenientes de diversos estados brasileiros. A coleta da urina ocorreu ocasionalmente, a qualquer hora do dia, o sangue total heparinizado foi então impregnado em um papel filtro específico para o exame, que tem quantidade máxima e mínima de sangue delimitada para não gerar resultados falsos. Esse papel filtro foi deixado em temperatura ambiente para a secagem e fixação do sangue, por um tempo mínimo de 3 horas, para então proceder com o exame. A urina foi congelada até o momento da realização das análises.

Análise por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas

Para a análise de ácidos orgânicos foram utilizadas urinas dos pacientes sintomáticos em crise metabólica. As análises foram feitas segundo descrito por Sweetmann²³, utilizando como padrões internos os ácidos hexadecano e heptadecanóico. Os ácidos orgânicos são extraídos utilizando acetato de etila e após se faz a derivatização utilizando N,O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetil-cloro-silano, sendo a identificação feita observando-se trimetil-silil compostos. A injeção é feita em dois cromatógrafos gasosos, Agilent 7850A e Agilent 5975C, sendo o primeiro um cromatógrafo gasoso com coluna capilar Varian CP-Sil 8 CB (30m, 0.53 mm, 1.5 micrometros) e com detector de FID (Ionização de chama) e o último um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massa com coluna capilar DB-SMS (Agilent, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,22 mm e filme de 0,25 micrometros) ambos com injeção open split utilizando Hélio como gás de arraste.

Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas

Para a análise de aminoácidos e acilcarnitinas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas foram utilizadas amostras de sangue impregnados em papel filtro. Esta análise foi feita somente em 11 pacientes do estudo. A análise foi feita segundo descrito por Rashed et al²⁷, o cromatógrafo líquido utilizado foi o Alliance 2695 (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Quattro Micro MS/MS (Perkin Elmer). As acilcarnitinas e aminoácidos são monitorizadas por MRM (monitorização de reação múltipla), com scan do íon pai 85 (m/z) ou scan de perda neutra 102 (m/z). A concentração é determinada pela resposta do analito em relação ao seu respectivo padrão interno lábil.

Análise molecular

Para a análise molecular e identificação da mutação presente foram utilizadas amostras de sangue impregnado em papel filtro. Esta análise foi feita em somente 11 pacientes deste estudo. A análise foi feita em Portugal, pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge do Ministério da Saúde, segundo descrito por Wang et al²⁹.

Dosagem da creatinina

Para a realização da dosagem dos ácidos orgânicos pelo cromatógrafo gasoso é necessário fazer o cálculo do volume de urina utilizado para cada paciente. Essa correção foi feita a partir do valor de creatinina urinária do paciente. A dosagem da creatinina foi feita utilizando o método de Jaffé modificado para microplacas.

RESULTADOS

Este estudo fornece dados sobre 45 pacientes diagnosticados com HMG, sendo 24 (53%) pacientes do sexo masculino e 21(47%) pacientes do sexo feminino, porém nem todos os dados de todos os pacientes foram obtidos; desta forma, o número total de dados varia nos parâmetros estudados.

Diagnóstico

O diagnóstico dos pacientes foi feito a partir da análise de ácidos orgânicos por CG/CG-MS na urina dos pacientes sintomáticos em crise. O perfil encontrado nos pacientes corrobora com o já relatado em publicações anteriores^{4,5,7,8,9,11,12,13}. Todos os 45 pacientes (100%) apresentaram aumento dos níveis do ácido 3-metilglutacônico, 40 pacientes (89%) apresentaram aumento dos níveis dos ácidos 3-hidroxi-isovalérico e 3-hidroxi-3-metilglutárico, 39 pacientes (86,7%) apresentaram aumento dos níveis do ácido 3-metilglutárico e 22 pacientes (49%) apresentaram aumento dos níveis da acilglicina 3-metil-crotonilglicina (Figura 1).

A análise de acilcarnitinas e aminoácidos por LC/MS/MS foi realizada em somente 11 pacientes. Todos estes 11 pacientes (100%) apresentaram um aumento da acilcarnitina C5OH, 8 pacientes (72,7%) apresentaram um aumento da C5OH/C2, 7 pacientes (63,6%) apresentaram um aumento da acilcarnitina C6DC e 3 pacientes (27,3%) apresentaram uma diminuição dos níveis de C0.

Histórico familiar e origens

40 pacientes do estudo (89%) possuem origem portuguesa, no caso de 8 pacientes (18%) a consanguinidade foi relatada pela família, 6 famílias (14%) relataram mais de um caso de suspeita da doença, mas somente 1 família (2,3%) possui dois filhos vivos diagnosticados (GDM e JDM, Tabela 1), sendo que as demais 5 famílias (11%) contam com histórico de morte infantil inexplicada (Tabela 1). De 43 dos 45 pacientes do estudo, constava o estado de origem na ficha clínica, sendo destes 12 pacientes (28%) do Estado de São Paulo, 6 pacientes (14%) do Estado do Paraná, 5 pacientes (11,6%) do Estado de Minas Gerais, 4 pacientes (9,3%) do Estado do Rio Grande do Sul. Os Estados do Ceará, Pará, Maranhão, Santa Catarina, Bahia, Distrito Federal e do Rio de Janeiro contam com 2 pacientes cada (4,6%). Por fim, os Estados do Espírito Santo e Rio Grande do Norte contam com 1 paciente (2,3%) cada.

Manifestações clínicas e alterações laboratoriais

Os pacientes tiveram o diagnóstico da doença somente após o aparecimento de sintomas clínicos. Um total de 44 pacientes dos 45 estudados tinham a idade relatada na ficha clínica, onde a maioria, 26 pacientes (59%), teve seu diagnóstico somente após o primeiro ano de vida, sendo a idade média de diagnóstico de 40 meses (3 anos e 4 meses), tendo 18 anos o paciente com o diagnóstico mais tardio. Alguns destes pacientes já no momento do diagnóstico apresentavam alterações neurológicas em seus exames de imagens, estes dados estão citados na Tabela 1. Os sintomas mais comuns relatados foram convulsões (46,7%), vômitos (44%) e dificuldade de alimentação (26,7%) (Tabela 2). Os achados laboratoriais mais comuns nos pacientes foram hipoglicemia (68,9%) e acidose metabólica (42%) (Tabela 2).

Análise molecular

A análise molecular foi feita somente em 11 pacientes, os seus resultados estão apresentados na Tabela 3. Pode-se ver que a principal mutação encontrada é a E37X que é definida pela mudança de códon (p. Glu37*) que possui origem Portuguesa³⁰, seguida da mutação V168fs (-2) que é originada pela mudança de local no DNA complementar (c.504_505delCT) sendo esta mutação de origem Espanhola³¹. Ambas mutações são mais comuns na Península Ibérica.

Uso de medicamentos e dietas

Um total de 22 (48,9%) dos 45 pacientes do estudo antes do diagnóstico já faziam o uso de alguma medicação como forma de tratamento. Dentre os medicamentos utilizados o mais comum é a L-carnitina, sendo utilizada por 11 (50%) dos 22 pacientes que já faziam algum tratamento, seguida pelo uso de anticonvulsivantes, que esteve presente no tratamento de 8 (36,4%) dos 22 pacientes. A grande maioria, assim como os dois citados anteriormente, dos medicamentos utilizados são de uso para controle de sintomas relacionados com as consequências trazidas pela deficiência da HMG- Coa liase, como pode ser visto na Tabela 4.

Como o diagnóstico destes pacientes aconteceu de forma tardia e somente após o aparecimento de sintomas, algumas hipóteses diagnósticas já haviam sido relatadas. Devido a isso alguns pacientes, 8 (17,8%) dos 45 reportados nesse estudo, já faziam algum tipo de dieta. As dietas relatadas contavam com restrição proteica em 7 (87,5%) dos 8 pacientes. Apenas 1 paciente também tinha como recomendação evitar o jejum prolongado, buscando se alimentar de 3 em 3 horas (Tabela 5).

DISCUSSÃO

A HMG é um erro inato do metabolismo e uma doença genética com herança autossômica recessiva que conta com cerca de 180 casos descritos na literatura até os dias atuais,^{4,6,7,8,9,10,11,12,13} tendo o presente estudo relatado mais 45 casos da doença. Isto parece demonstrar uma possível alta prevalência desta acidemia na população brasileira, podendo ser ainda mais prevalente se formos considerar o fato de que o Brasil não possui uma triagem neonatal para essa doença o que faz com que muitos outros casos não tenham sido diagnosticados ou tenham sido subdiagnosticados.

Das acidemias diagnosticadas no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a HMG é a 4ª mais prevalente⁸. A prevalência é bastante alta para essa doença em Portugal¹⁰ e na Arábia Saudita⁷, sendo que neste último caso a grande prevalência de diversos erros inatos do metabolismo se deve a maior consanguinidade da população. Dos 45 pacientes citados neste estudo, 40 possuem ancestralidade portuguesa. A influência desta origem de Portugal é confirmada quando observamos a Tabela 3 que apresenta o diagnóstico molecular feito em alguns destes pacientes, onde a principal mutação é a E37x que possui origem Portuguesa, seguida da mutação V168fs (-2) que tem origem Espanhola. Estes dados reforçam a teoria do gene fundador da Península Ibérica no Brasil.

Como podemos observar na Tabela 1, dos 45 pacientes diagnosticados, 2 são irmãos (JDM e GDM) que foram diagnosticados no mesmo dia e já na 1ª infância. Assim como esta, outras 5 famílias que tiveram diagnósticos relataram que um filho anteriormente já havia apresentado os mesmos sintomas e teria falecido de forma inexplicada. Neste ponto podemos observar a importância do aconselhamento genético e da triagem neonatal para esta doença, assim como para muitos outros erros inatos do metabolismo, de forma que estas famílias poderiam optar de forma consciente em correr o risco de ter mais um filho com a doença ou mesmo em outras formas de se ter um filho, como a adoção.

A Tabela 2 descreve os sinais e sintomas bem como os achados laboratoriais dos pacientes estudados. Analisando os dados, pode-se sugerir que em pacientes que apresentam vômitos, convulsões, hipoglicemia e acidose metabólica deve-se solicitar coleta de urina e sangue para análise de ácidos orgânicos e acilcarnitinas, respectivamente, no intuito de investigar a presença da HMG.

Visto que o diagnóstico destes pacientes somente ocorreu após o início da sintomatologia, uma boa parte destes pacientes já fazia uso de medicamentos ou de alguma dieta, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5. Isso se deve ao fato de que muitas vezes os sintomas não são específicos para a HMG e sim para um grupo maior de erros inatos do

metabolismo, sendo comum em algumas aminoacidopatias e acidemias orgânicas. O tratamento com restrição proteica e suplementação de L-carnitina não é indicado somente para a HMG, mas também para outras doenças que envolvem deficiência na degradação, transporte e metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos. Desta forma, ao se administrar o tratamento tendo somente a suspeita clínica de que se trata algum erro inato do metabolismo, mesmo que sem diagnóstico conclusivo de qual doença, não haverá a princípio um prejuízo ao paciente e poderá levar a um abrandamento da sintomatologia e dos efeitos nocivos causados pelos metabólitos acumulados, o que melhora a qualidade de vida do paciente até que se tenha o diagnóstico definitivo e seja implementado o tratamento específico.

Por outro lado, um tratamento prévio que se baseia em uma dieta de restrição proteica pode levar a um falso negativo nos exames de triagem e confirmatórios, pois estes exames se baseiam no acúmulo dos metabólitos nos tecidos e no sangue. Desta forma, algumas vezes se faz necessário a coleta de uma segunda amostra biológica na ausência de tratamento para confirmação diagnóstica.

Sendo assim é possível observar neste estudo que os pacientes com HMG são na sua grande maioria crianças, que possuem como sintomas mais comuns vômitos, convulsões e recusa alimentar, tendo como principais alterações laboratoriais a hipoglicemia e a acidose metabólica, não sendo mais prevalente a um Estado brasileiro, acometendo ambos os sexos e sendo mais comum em pessoas que possuem descendência portuguesa.

Os dados apresentados neste estudo descrevem um grande número de casos de acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica na população brasileira, sugerindo a implantação de uma triagem neonatal expandida em todo o território nacional para esta doença, que já ocorre em outros países, sendo feita utilizando um cromatografo liquido acoplado a espectrômetro de massas (LC/MS/MS) em amostras de sangue impregnadas em papel filtro. Esta abordagem permitiria o diagnóstico precoce, antes da manifestação clínica, bem como a instituição da terapêutica nos primeiros dias de vida, evitando crises agudas e complicações crônicas da doença. Porém, para que isto ocorra será necessário investir em equipamentos e em profissionais qualificados para as análises, bem como em publicidade, de forma a conscientizar os médicos, mas principalmente as famílias e a população em geral da importância do teste do pezinho (triagem neonatal) como um todo. Entretanto, enquanto isto não for implementado ressalta-se a importância do diagnóstico ainda que tardio desta patologia, o que permite evitar o óbito e instituir a terapêutica adequada.

REFERÊNCIAS

1. Clinkenbeard KD, Reed WD, Mooney RA, Lane MD. Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. *J. Biol. Chem.* 1975; 25: 3108 - 3116.
2. Dasouki M, Buchanan D, Mercer N, Gibson KM, Thoene J. 3-Hydroxy-3-methylglutaric Aciduria: Response to Carnitine Therapy and Fat and Leucine Restriction. *J. Inher. Metab. Dis.* 1987; 10:142-146.
3. Faull K, Bolton P D, Halpern B, Hammond J, Danks D, Hahnel R, Wilkinson S P, Wysocki S. J, Masters P L. Patient with defect in leucine metabolism. *N. Engl. J. Med.* 1976; 294: 1013.
4. Gibson KM, Breuer J, Nyhan WL. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur. J. Pediatr.* 1988; 148(3): 180–186.
5. Barash V, Mandel H, Sella S, Geiger R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: biochemical studies and family investigation of four generations. *J Inherit Metab Dis.* 1990; 13(2):156 - 164.
6. Pié J, López-Viñas E, Puisac B, Menao S, Pié A, Casale C, Ramos FJ, Hegardt FG, Gómez-Puertas P, Casals N. Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2007; 92(3): 198–209.
7. Ozand PT, al Aqeel A, Gascon G, Brismar J, Thomas E, Gleispach H. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency in Saudi Arabia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1991; 14 (2): 174–188.
8. Vargas CR, Sitta A, Schmitt G, Ferreira GC, Cardoso ML, Coelho D, Gibson KM, Wajner M. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008; 31 (3): 511–515.
9. Menao S, López-Viñas E, Mir C, Puisac B, Gratacós E, Arnedo M, Carrasco P, Moreno S, Ramos M, Gil MC, Pié A, Ribes A, Pérez-Cerda C, Ugarte M, Clayton PT, Korman SH, Serra D, Asins G, Ramos FJ, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, Casals N, Pié J. Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Hum. Mutat.* 2009; 30 (3): 520–529.
10. Cardoso ML, Rodrigues MR, Leão E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E, Garcia P, Rolland MO, Vilarinho L. The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2004; 82(4): 334 – 338.
11. Grünert SC, Schlatter SM, Schmitt RN, Gemperle-Britschgi C, Mrázová L, Balci MC, Bischof F, Çoker M, Das AM, Demirkol M, de Vries M, Gökçay G, Häberle J, Uçar SK, Lotz-Havla AS, Lücke T, Roland D, Rutsch F, Santer R, Schlune A, Staufner C, Schwab KO, Mitchell GA, Sass JO. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Clinical presentation and outcome in a series of 37 patients. *Mol. Genet. Metab.* 2017; 121: 206 - 215.
12. Wysocki SJ, Hähnel R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase deficiency: a review. *J Inherit Metab Dis.* 1986; 9(3): 225 - 233.
13. Muroi J, Yorifuji T, Uematsu A, Shigematsu Y, Onigata K, Maruyama H, Nobutoki T, Kitamura A, Nakahata T. Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum Genet.* 2000; 107(4): 320 - 326.
14. Wilson WG, Cass MB, Søvik O, Gibson KM, Sweetman L. A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 1984; 142: 289–291.

15. Duran M, Schutgens RB, Ketel A, Heymans H, Bertssen MW, Ketting D, Wadman SK. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency: Postnatal management following prenatal diagnosis by analysis of maternal urine. *J. Pediatr.* 1979; 95: 1004 - 1007.
16. Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res.* 1984; 18(12):1325 - 1328.
17. Norman EJ, Denton MD, Berry HK. Gas-chromatographic/mass spectrometric detection of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency in double first cousins. *Clin Chem.* 1982; 28(1):1371- 140.
18. Cahill Jr GF, Owen OE, Morgan AP. The consumption of fuels during prolonged starvation. *Adv Enzyme Reg.* 1968; 6: 143 - 150.
19. Ketel A, Ket JL, Schutgens RBH, Duran M, Wadman SK. Clinical and biochemical observations on a child with a deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase. *J Inherit Metab Dis.* 1980; 3: 89 - 90.
20. Robinson BH, Oei J, Sherwood WG, Slyper AH, Heininger J, Mamer OA. Hydroxymethylglutaryl CoA lyase deficiency: Features resembling Reye syndrome. *Neurology.* 1980; 30: 714 - 718.
21. Faull K F, Bolton P D, Halpern B, Hammond, Danks D M. The urinary organic acid profile associated with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Clin. Chim. Acta.* 1976; 73: 553 - 559
22. Mitchell G, Fukao T, Inborn errors of ketone body metabolism, in: C. Scriver, et al., (Eds.), *The metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York 2001, 2327–2356.
23. Sweetman L (1995) Organic acid analysis. In: Hommes FA (ed) *Techniques in diagnostic human biochemical laboratories: A laboratory manual*. Wiley-Liss, Inc., New York, 143–176.
24. Gibson KM, Sweetman L, Nyhan WL, Page TM, Greene C, Cann HM. 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria: a new assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase using high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 1982; 126: 171- 181.
25. Norman EJ, Denton MD, Berry HK. Gas-chromatographic/mass spectrometric detection of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency in double first cousins. *Clin Chem.* 1982; 28 (1):137 - 140.
26. Matern D. Acylcarnitines, including in vitro loading tests, in: N. Blau, M. Duran, K. Gibson (Eds.), *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Springer, Berlin. 2008:171–206.
27. Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Douglas L. Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism from Blood Spots by Acylcarnitines and Amino Acids Profiling Using Automated Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Pediatric Research.* 1995; 38: 324 – 331.
28. Mitchell GA, Robert MF, Hruz PW, Wang S, Fontaine G, Behnke CE, Mende-Mueller LM, Schappert K, Lee C, Gibson KM, Mizioro HM. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL): cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 4376 - 4381.
29. Wang SP, Robert MF, Gibson KM, et al. 3-Hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics.* 1996; 33: 99–104.
30. Pié J, Casals N, Casale CH, et al. A nonsense mutation in the 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase gene produces exon skipping in two patients of different

- origin with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Biochem. J.* 1997; 323: 329 – 335.
31. Casals N, Pié J, Casale CH. A two-base deletion in exon 6 of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL) gene producing the skipping of exons 5 and 6 determines 3-hydroxy-3-methylglytaric aciduria. *J. Lipid Res.* 1997; 38: 2303 – 2313.

DL	M	2 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
ESPM	F	10 meses	Maranhão	Consanguinidade (Avô materno irmão de avó paterna).	Normal	Sem casos na família	Não relatado
JKTM	M	4 anos	Ceará (Fortaleza)	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
JDM	F	4 anos e 7 meses	Pará	Sem consanguinidade	Normal	Irmão com a mesma doença (GDM)	Não relatado
GDM	M	3 anos	Pará	Sem consanguinidade	Normal	Irmã mais velha com a mesma doença (JDM)	Não relatado
MCAS	F	6 anos e 3 meses	Rio Grande do Sul (Porto Alegre)	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
MARF	M	9 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
WEFN	F	8 anos e 2 meses	Ceará	Sem consanguinidade	Ressonância Magnética: Leucodistrofia	Sem casos na família	Não relatado
DCSR	M	3 anos e 3 meses	Espirito Santo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
GSB	M	2 anos e 2 meses	Bahia	Consanguinidade (Pais primos de 1º grau)	Normal	Sem casos na família	Não relatado
MKSF	F	1 mês	Paraná	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
DPC	F	14 anos e 4 meses	Minas Gerais	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
MEBS	F	3 anos e 5 meses	Paraná	Sem consanguinidade	Leucodistrofia	Sem casos na família	Não relatado
HMO	M	4 meses	Minas Gerais	Sem consanguinidade	Tomografia: Hipodensidade difusa	Sem casos na família	Não relatado
AFFM	M	11 meses	Paraná	Sem consanguinidade	Tomografia: Atrofia dos lobus frontais	Sem casos na família	Não relatado
LSR	F	8 meses	Distrito Federal	Consanguinidade dos Pais	Microcefalia	Sem casos na família	Não relatado
DVA	M	9 anos e 1 mês	Rio de Janeiro	Consanguinidade (Pais primos de 1º grau)	Normal	Sem casos na família	Não relatado

ALRO	F	4 anos e 5 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
ATC	F	1 mês	Maranhão	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
MEE	F	2 anos	Minas Gerais	Consanguinidade (Pais primos de 1º grau)	Normal	2 filhos foram a óbito com 2 dias de vida	Paciente foi a óbito
GHBA	M	1 ano e 3 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Ressonância Magnética: Atrofia Difusa	Sem casos na família	Paciente foi a óbito
IICF	F	7 meses	Paraná	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
JFSM	F	5 anos e 10 meses	Distrito Federal	Sem consanguinidade	Microcefalia desde 2005 Tomografia: Atrofia cerebral	Sem casos na família	Não relatado
DLS	F	12 anos e 7 meses	Minas Gerais	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
ACF	M	2 anos	São Paulo	Consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
EDFS*	M	1 ano e 6 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
WSM*	M	9 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
GA*	F	13 anos	Não informado	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
VGO*	M	18 anos	Rio de Janeiro	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Paciente foi a óbito
ECS*	F	10 meses	Rio Grande do Sul	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
TAAF	F	3 anos e 6 meses	Paraná	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
GMO*	M	11 meses	Não informado	Sem consanguinidade	Normal	Irmão falecido com quadro semelhante	Paciente foi a óbito
FFF*	M	2 anos	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
JCAA*	M	8 anos e 6 meses	Minas Gerais	Consanguinidade (Pais primos de 1º grau)	Necrose estriar aguda	Sem casos na família	Não relatado
MOM*	F	3 anos	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
LWB*	M	1 mês	Rio Grande do Sul	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado

FGC*	M	1 ano e 6 meses	São Paulo	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
VF*	M	4 meses	Santa Catarina	Pais consanguíneos	Normal	Irmão de 6 dias falecido	Paciente foi a óbito
RGLN*	M	7 meses	Não informado	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado
DSP*	M	8 meses	Santa Catarina	Sem consanguinidade	Encefalopatia aguda	Sem casos na família	Não relatado
JS *	M	1 ano de 8 meses	Rio Grande do Sul	Sem consanguinidade	Normal	Sem casos na família	Não relatado

Os pacientes assinalados com * já tiveram parte dos seus dados citados anteriormente⁸ por Vargas et al; 2007.

Tabela 2: Principais sintomas clínicos e achados laboratoriais dos pacientes diagnosticados com acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica.

Sintomas	Número de pacientes	Porcentagem de ocorrência
Convulsões	21	46,67%
Vômitos	20	44,44%
Dificuldades de alimentação	12	26,67%
Retardo neuropsicomotor	11	24,44%
Hepatomegalia	9	20%
Hipotonia	8	17,78%
Déficit cognitivo	6	13,33%
Alteração do tônus muscular	5	11,11%
Coma	5	11,11%
Deterioração psicomotora	4	8,89%
Retardo psicomotor	4	8,89%
“Failure to thrive”	4	8,89%
Letargia	4	8,89%
Dismorfias	2	4,44%
Atrofia	2	4,44%
Dados laboratoriais	Número de pacientes	Porcentagem
Hipoglicemia	31	68,89%
Acidose metabólica	19	42,22%
Acidemia láctica	4	8,89%
Hiperamonemia	3	6,67%
Cetonúria	2	4,44%
Anemia	1	2,22%

Tabela 3: Análise molecular dos pacientes diagnosticados com acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica.

Paciente	Mutação
RGLN	p.Glu37*/c.504_505delCT
GA	c.504_505delCT/p.Asp42Asn
VGO	p.Glu37*/c.504_505delCT
ECS	p.Glu37*/p.Glu37*
DSP	p.Glu37*/p.Glu37*
AFFM	p.Glu37*/p.Glu37*
JFSM	p.Glu37*/p.Glu37*
ECS	c.348+1 G>A/c.348+1 G>A
MEBS	p.Glu37*/c.230delT
LWB	p.Pro175Arg/p.Pro175Arg
HMO	p.Glu37*/?

Tabela 4: Medicamentos utilizados pelos pacientes antes do diagnóstico da acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica.

Paciente	Medicamento
WEFN	L- carnitina
MARF	Fenobarbital
GDM	L- carnitina, fenobarbital e polivitamínico
JDM	L- carnitina, fenobarbital
ESPM	Bicarbonato
DL	L- carnitina
MEAM	L- carnitina, bicarbonato
LSOM	Fenitoína, polivitamínico, L- carnitina, Co enzima Q-10 e L- arginina
GRZ	Lactulona, metronidazol
MOM	L- carnitina
JCAA	Fenobarbital
LWB	Fenobarbital
FGC	L- carnitina
VF	L- carnitina
RGLN	Antibiótico
WSM	L- carnitina
DSP	L- carnitina
VGO	Fenobarbital, fluconazol, fenitoína, clobazn, ciprofloxacino
ACF	Cloridrato de valaciclovir
GHBA	Puran T4, fenobarbital, ranitidina, sulfato ferroso
IICF	Penicilina
JFSM	Valproato de sódio

Tabela 5: Dietas utilizadas pelos pacientes antes do diagnóstico de acidemia 3-hidroxi-3-metilglutárica.

Paciente	Dieta
GDM	Restrição proteica
JDM	Restrição proteica
ALRO	Alimentar-se de 3 em 3 horas
FGC	Restrição proteica e lipídica, rica em carboidratos
VF	Restrição proteica e lipídica, rica em carboidratos
RGLN	Restrição proteica
WSM	Restrição proteica
DSP	Restrição proteica e lipídica, rica em carboidratos

Anexo 2: Normas da revista

AND POLICY

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms. CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials. All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors. The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

FORM AND PREPARATION OF ARTICLES

The following categories of contributions will be considered for publication

Editorial

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal’s editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

Review Articles

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for systematic reviews – see abstract structure in ‘Original Articles’) and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

Special Articles

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

Original Articles

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words. Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

Case Reports

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports. Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient.

Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

Case Reports: Images in Medicine

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

Letters

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

Brief Communication

Brief Communications are original but preliminary or more specific research results that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. The structure is similar to original articles; however, the Abstracts (Portuguese, Spanish or English) should not exceed 150 words and the text should not exceed 1,200 words. A maximum of two Tables/Figures are accepted.

Supplements

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

CONFLICTS OF INTEREST

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest and should be done at the time of submission of the manuscript. It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

PRIVACY AND CONFIDENTIALITY

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 466/2012 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

PREPARATION OF THE ARTICLE

The registration on the system as author and subsequent access with login and password are mandatory to submit and verify the status of submissions. Identification: must include: a) Title of the article, clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) Authors' full names; c) Institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) Indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; e) If it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

THE NAMES OF ALL THE AUTHORS OF THE MANUSCRIPT SHOULD BE INDICATED IN THE SYSTEM

Abstract and Keywords: The articles should have an abstract in English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the

subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>.

Manuscript: it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference 1 .

Tables: they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

Figures and charts: Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the other they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both must precede the figure itself.

Abbreviations: abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name.

Name of medications: the generic name should be used.

In case of citing appliances/equipment: all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

Acknowledgements: should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

Conflicts of interest: If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: "The authors declare no conflicts of interest"]

References: should be numbered consecutively, in the other in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called "Vancouver Style", as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors' names correctly spelt. The accuracy of references is the authors' responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

Examples of citing references:

Journal articles (from one to six authors)

Almeida OP. A autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? *Rev Bras Psiquiatr.* 1998;20:113-6.

Journal articles (more than six authors)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 1986;315:157-61.

Articles without the author's name

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J.* 1994;84:15.

Books

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses.* 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Chapters from a book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management.* 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Books in which editors (organizers) are authors

Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people.* New York: Churchill Livingstone; 1996.

Theses

Kaplan SJ. *Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization* [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Papers presented at conferences

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland.* Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Electronic Journal Articles

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from:
[URL:http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm).

Other types of reference should follow the document International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts

Submitted to Biomedical Journals: Sample References
(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Technical requirements

Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 12, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.

2018 Apr 6