

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação do potencial efeito terapêutico de uma nanopartícula de ácido fenilbutírico em ratos submetidos a um modelo crônico da Doença da Urina do Xarope do Bordo

Felipe Maciel Catarino

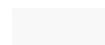
Porto Alegre, julho de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação do potencial efeito terapêutico de uma nanopartícula de ácido fenilbutírico em ratos submetidos a um modelo crônico da Doença da Urina do Xarope do Bordo

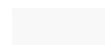
Felipe Maciel Catarino
Orientadora: Prof^a.Dra. Carmen Regla Vargas
Co-orientadora: Dra. Caroline Paula Mescka

Porto Alegre, julho de 2018.



“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa de
sucesso. O sucesso é consequência”

Albert Einstein



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer à professora Carmen, pela orientação, dedicação, paciência, aprendizado e por me receber em seu laboratório e grupo de pesquisa. Exemplo de orientadora, professora e pesquisadora.

À Carol pela coorientação, amizade, companheirismo e todos ensinamentos durante esses 4 anos no Laboratório 34 do Departamento de Bioquímica. Andrea, professor Dutra e Carol sem dúvidas me ensinaram tudo o que eu sei em relação a pesquisa e o dia-a-dia de um laboratório.

Aos amigos que durante minha trajetória academia formei, em especial á Sendy e Thales. Sendy, minha melhor amiga dentro e fora da faculdade, irmã do coração, sem tua enorme ajuda em todos os aspectos nada disso seria capaz. Thales meu irmãozinho, as risadas e brincadeiras esses anos todos tornaram o ambiente universitário mais divertido e leve.

À minha namorada Natália e sua família por estarem ao meu lado nos momentos bons e não tão bons. Pelas palavras, amor, carinho, confiança e principalmente por me ensinar que nunca devo desistir quando encontrado um obstáculo. Por me dar o prazer de conviver com uma criança maravilhosa e iluminada, meu querido enteado Enzo.

Aos meus irmãos Lucas e Bruna por todos os dias me mostrarem, cada um de sua forma, que estão e estarão sempre presentes para me ajudar no que for. Bruna, minha gêmea e meu exemplo de dedicação e profissional, sem teu apoio não teria chegado até aqui. Lucas, obrigado por me dar o prazer de ser dindo da nenê mais lindo desse mundo, da nossa Manu.

Ao meu Pai e a Mari pelos conselhos, apoio e servirem como exemplo de pessoas batalhadoras e trabalhadoras.

À minha Mãe que acompanhou toda minha trajetória de vida, me apoiou em todas as decisões e me mostrou o que é ter um amor incondicional pelos seus filhos. Uma guerreira que dedicou toda a sua vida para com a criação de seus.

APRESENTAÇÃO

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista "Clinical & Biomedical Research" em anexo. Este contém os seguintes tópicos: Introdução, Métodos e Discussão. Os experimentos foram realizados no Biotério e Laboratório 34 do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratório de Análise de Metabólitos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MÉTODOS	11
Preparação da nanopartícula contendo fenilbutirato.....	11
Modelo de indução crônica de MSUD.....	11
Obtenção da amostra biológica	12
Quantificação dos metabólitos acumulados no plasma	12
Análise estatística	12
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	13
REFERÊNCIAS.....	16
APENDICE A - FIGURAS.....	19
ANEXO 1 – NORMAS PARA A REVISTA.....	25

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO TERAPÊUTICO DE UMA
NANOPARTÍCULA DE ÁCIDO FENILBUTÍRICO EM RATOS SUBMETIDOS A
UM MODELO CRÔNICO DA DOENÇA DA URINA DO XAROPE DO BORDO

EVALUATION OF THE POTENTIAL THERAPEUTIC EFFECT OF A
PHENYLBUTYRIC ACID NANOPARTICLE IN RATS SUBMITTED TO A
CHRONIC MODEL OF MAPLE SYRUP URINE DISEASE

Felipe Maciel Catarino¹, Caroline Paula Mescka³, Carmen Regla Vargas^{2,3,4}

¹ Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴ Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor correspondente:

Carmen Regla Vargas. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS CEP 90035-903, Brasil. E-mail: crvargas@hcpa.edu.br

RESUMO

Introdução: A Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD) é um Erro Inato do Metabolismo caracterizado pelo acúmulo em tecidos e fluidos corporais de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), Leucina (Leu), Isoleucina (Ileu) e Valina (Val) e de seus α -cetoácidos correspondentes devido a deficiência na atividade do complexo multienzimático da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. O diagnóstico é feito pela detecção no plasma, destes metabólitos em altas concentrações, principalmente Leu. O ácido fenilbutírico vem sendo utilizado de forma eficaz como tratamento para outros distúrbios metabólicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial efeito terapêutico de uma nanopartícula de ácido fenilbutírico em ratos submetidos a um modelo crônico de MSUD. **Métodos:** O modelo experimental crônico de MSUD foi composto por 4 grupos: grupo controle (salina); grupo ácido fenilbutírico (50 mg/kg) intraperitoneal (I.P.); grupo MSUD (pool de BCAA: 15,8 μ L/g contendo 190 mmol/L Leu, 59 mmol/L Ile e 69 mmol/L Val) subcutânea (S.C.); grupo MSUD+nano (50 mg/kg de ácido fenilbutírico I.P. e pool de BCAA 15,8 μ L/g S.C.). A dosagem dos aminoácidos no plasma foi feita por HPLC SHIMADZU Ic-20ad. A nanopartícula de ácido fenilbutírico foi obtida utilizando Ultra-Turrax T10 basic. **Resultados:** As concentrações de Leu, Ileu e Val nos grupos Nano + MSUD foram estatisticamente menores quando comparado ao grupo MSUD. **Conclusão:** O tratamento com nanopartícula de ácido fenilbutírico foi eficaz em diminuir Leu, Ileu e Val em plasma de ratos submetidos ao modelo crônico eMSUD, podendo ser um tratamento promissor nesta doença, que atualmente é de restrição proteica.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope do Bordo, Ácido fenilbutírico, Tratamento, Modelo Crônico.

ABSTRACT

Introduction: The Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an Inborn Error of Metabolism characterized by the tissue accumulation of branched chain amino acids in tissue and body, Leucine (Leu), Isoleucine (Ileu) and Valine (Val) and their corresponding α -keto acids due to a deficiency of the dehydrogenase multienzyme complex of branched chain α -keto acids. Diagnostic is made by detecting high concentration in plasma of these metabolites, especially Leu. The phenylbutyric acid has been used effectively as a treatment for other metabolic disorders. The objective of this study was to evaluate the potential therapeutic effects of phenylbutyric acid nanoparticle in rats subject to a chronic model of MSUD. **Methods:** The experimental chronic model of MSUD had 4 groups: control group (saline); phenylbutyric acid group (50 mg/kg) intraperitoneal (I.P.); MSUD group (BCAA pool: 15.8 μ L/g containing 190 mmol/L Leu, 59 mmol/L Ile and 69 mmol/L Val) subcutaneous (S.C.); MSUD + nano group (50 mg/kg of phenylbutyric acid I.P. and pool of BCAA 15.8 μ L/g S.C). The amino acid dosage in plasma was made by HPLC SHIMADZU Ic-20ad. The phenylbutyric acid nanoparticle was obtained using Ultra-turrax T10 basic. **Results:** The concentrations of Leu, Ileu and Val in the Nano + MSUD group were statistically reduced when compared to the MSUD group. **Conclusion:** The phenylbutyric acid nanoparticle treatment was effective in lowering Leu, Ileu and Val in plasma of rats subject to a chronic model of MSUD, and could be a promising therapy for MSUD patients since current treatment is a protein restricted diet.

Keywords: Maple Syrup urine Disease, Acid Phenyl Butyric, Treatment, Chronic Model.

INTRODUÇÃO

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD) é um Erro Inato do Metabolismo (EIM) de caráter autossômico recessivo causado por deficiência severa na atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAD)¹. Esta deficiência metabólica resulta em acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) e de seus α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKA) correspondentes, α -cetoisocapróico (KIC), α -ceto- β -metilvalérico (KMV) e α -cetoisovalérico (KIV), e em menor extensão de seus α -hidroxiácidos resultantes da redução de seus α -cetoácidos, α -hidróxi-isocapróico, α -hidróxi- β -metilvalérico e α -hidroxivalérico em tecidos e fluidos corporais^{2,3}. A MSUD possui uma incidência global de 1:185.000 nascidos vivos, embora em algumas comunidades menonitas e holandesas na Pensilvânia, Estados Unidos, a taxa pode chegar até 1:200 nascidos vivos^{2,4}. No Brasil, em estudo realizado, a incidência aproximada é de 1:84.000 nascidos vivos⁵. A MSUD possui manifestações clínicas variadas e pode ser classificadas em 5 fenótipos: intermitente, clássica, intermediária, responsiva a tiamina e deficiência de diidrolipoildesidrogenase. Essa classificação varia de acordo com a apresentação clínica da doença, tolerância à Leu e o nível de atividade residual de BCKAD². Os sinais e sintomas mais comumente encontrados em pacientes com a forma clássica desta doença é cetoacidose, ataxia, coma, urina com odor de xarope do bordo, retardo mental e psicomotor⁴.

O diagnóstico da MSUD é feito pela avaliação dos níveis dos BCAA no sangue e BCKA na urina, por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, respectivamente. A L-aloisoleucina, aminoácido resultante da reação de racemização da Ile, é encontrado no sangue de pacientes que tiveram descompensação metabólica e considerado um achado característico, mas não exclusivo da doença². O diagnóstico confirmatório deve-se a avaliação da atividade da BCKAD em leucócitos periféricos, cultura de linfoblastos ou fibroblastos dos pacientes e biópsia hepática^{2,6}.

A BCKAD possui três sítios catalíticos, E1, E2 e E3. O gene de cada subunidade estão localizados em cromossomos diferentes. Mutações em qualquer um desses genes podem levar a deficiência de BCKAD ocasionando a MSUD. Já existem relatos de mais de 90 mutações nestes genes, mas não de uma que possua maior prevalência, exceto em estudo em comunidades isoladas específicas. A abordagem molecular envolve uma avaliação completa desses 3 genes, e não avaliação isolada⁷.

A MSUD é passível de tratamento através de restrição dietética de BCAAs, e com o tratamento precoce os pacientes geralmente têm bons resultados clínicos. O tratamento visa normalizar as concentrações de BCAAs, afim de minimizar danos cerebrais, prevenindo o catabolismo proteico e manutenção da síntese proteica normal, e deve ser iniciado o mais precocemente possível. Consiste em dieta hipercalórica e hipoprotéica com utilização de fórmulas específicas contendo aminoácidos essenciais, excetos os acumulados na doença, com aporte de vitaminas e sais minerais^{2,8}. Apesar de ainda não ter sido descoberto um tratamento ideal para essa desordem metabólica, terapias auxiliares complementares têm sido estudadas com finalidade de melhorar a

adesão de pacientes ao tratamento devido à restrição dietética severa, como a utilização de fenilbutirato (ácido fenilbutírico). Brunetti-Pierrri et al.⁹ analisaram fibroblastos e plasma de pacientes MSUD suplementados com fenilbutirato (com ingesta normal de proteínas na alimentação) e observaram que houve diminuição dos níveis de BCAA e BCKA em plasma de pacientes MSUD e aumento na atividade residual do BCKAD em células *in vitro*. Apesar de seu mecanismo não ser bem esclarecido, este composto é conhecido por diminuir as concentrações de BCAA em pacientes com desordens do ciclo da uréia⁹. Ademais, o fenilbutirato vem sendo testado em outras doenças neurodegenerativas como adjuvante no tratamento, como na Doença de Alzheimer e na Doença de Parkinson^{10,11}.

Os fármacos quando administrados de forma sistêmica possuem biodistribuição em todo o organismo, sendo necessário altas doses para que no local de ação atinja-se a concentração terapêutica. Altas doses de fármaco, podem acarretar toxicidade e efeitos adversos, portanto, a incorporação dos mesmos em nanopartículas parece ser vantajosa, visto que a utilização de nanopartículas aumenta a concentração no sítio de ação com menores doses, reduzindo a possibilidade de efeitos adversos e aumentando a eficácia do tratamento¹². Já existem relatos na literatura de que nanopartículas revestidas com polissorbato 80 levam a um aumento da concentração do fármaco no tecido cerebral em comparação ao fármaco na forma livre e com outros estabilizantes^{13,14}. Este revestimento possibilita a adsorção de apolipoproteínas B e E, que estão relacionadas a processos de endocitose mediada por receptor. Essa adsorção faz com que essas partículas possam atuar como Cavalos-de-Troia, podendo penetrar na barreira hematoencefálica¹⁵.

Diante disso, este trabalho objetivou analisar a capacidade de uma nanopartícula sintetizada contendo ácido fenilbutírico em diminuir as concentrações dos metabólitos acumulados na MSUD no plasma de ratos submetidos a um modelo crônico da doença.

MÉTODOS

Preparação da nanopartícula contendo fenilbutirato

Uma quantidade determinada de ácido fenilbutírico (10% p/v) foi dissolvida em etanol e incorporada em monoleína durante 24h em banho a 40 ± 5 °C. Após evaporação do etanol, a mistura resultante foi cisalhada na presença de uma solução aquosa de polissorbato 80 empregando-se o equipamento Ultra-Turrax T10 basic (Ika, Alemanha). Assim, foram obtidas duas formulações: 1° Nanopartícula branca (contendo apenas monoleína e polissorbato 80) e 2° Nanopartícula com ácido fenilbutírico 10%^{16,17}.

Modelo de indução crônica de MSUD

Foram utilizados 16 ratos Wistar de 5 a 7 dias de vida, machos e fêmeas, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O modelo experimental foi adaptado de acordo com estudos utilizando

Leu, Ile e Val que mimetizaram em ratos as concentrações cerebrais e plasmáticas dos aminoácidos de pacientes acometidos com MSUD^{18,19}. Os ratos foram submetidos ao modelo crônico de 15 dias, a fim de avaliar o efeito neuroprotetor das nanopartículas de ácido fenilbutírico na presença de altas concentrações de BCAA e divididos em 4 grupos: grupo controle (solução salina); grupo ácido fenilbutírico (50 mg/kg de peso corporal); grupo MSUD (pool de BCAA: 15,8µL/g de peso corporal contendo 190 mmol/L Leu, 59 mmol/L Ile e 69 mmol/L Val); grupo MSUD+nanopartículas de ácido fenilbutírico (50 mg/kg de peso corporal de ácido fenilbutírico e pool de BCAA -15,8µL/g de peso corporal contendo 190 mmol/L Leu, 59 mmol/L Ile e 69 mmol/L Val). Este trabalho foi aprovado pela CEUA da UFRGS (nº 32104).

Obtenção da amostra biológica

Após anestesia, animais foram submetidos a perfusão cardíaca para coleta do sangue total e posterior separação do plasma. A anestesia foi preparada com soluções de ketamina 100 mg/mL e de xilazina 100 mg/mL utilizadas na proporção de 10:1 (ketamina:xilazina), em um volume de 1,1 mL/kg e dose de 100 mg de ketamina e 10 mg de xilazina por quilo de peso corporal por injeção intraperitoneal. Em caso de sedação insuficiente, foi repetida apenas a injeção de ketamina em um volume de 1/3 a 1/2 do utilizado originalmente.

Quantificação dos metabólitos acumulados no plasma

As concentrações de Leu, Ileu, Val foram analisadas em amostras de plasma por método de cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com Joseph and Marsden, 1986, utilizando metanol e tampão fosfato como fase móvel, coluna de fase reversa (ODS) e detector de fluorescência²⁰. A quantificação foi realizada por padronização interna, empregando ácido homocisteico. Os resultados foram expressos em µmol/L. As figuras 1,2,3 e 4 mostram os cromatogramas ilustrativos dos grupos Controle, MSUD, Nano e Nano + MSUD, respectivamente.

Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizada ANOVA seguido de Tukey para múltipla comparação quando o valor de F foi significativo. Todas as análises foram efetuadas através do software GraphPad Prism 7. Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados referentes aos níveis de plasmáticos dos BCAAs estão demonstrados nas figuras 5, 6 e 7.

Na figura 5, verifica-se que o nível de Leu foi significativamente maior quando comparado o grupo MSUD com grupo Controle ($p=0,0008$). Com relação aos grupos Nano e Nano + MSUD, observa-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo de Leu quando comparados ao grupo

MSUD ($p=0,02$), ficando os níveis estatisticamente igual ao grupo controle. Em relação a figura 6, pode-se observar que houve um aumento significativo da Ileu no grupo MSUD quando comparado ao grupo Controle ($p=0,0016$) e diminuição no grupo Nano e Nano + MSUD em relação ao grupo MSUD ($p=0,0019$), havendo reversão para os valores do grupo controle. Na figura 7, pode-se constatar que houve aumento estatisticamente significativo da Val no grupo MSUD quando comparado ao Controle ($p=0,0016$) e diminuição nos grupos Nano e Nano + MSUD quando comparados ao grupo MSUD ($p=0,019$ e $p=0,0081$, respectivamente), reduzindo também significativamente ao nível de controle.

DISCUSSÃO

MSUD é um EIM, que se caracteriza em termos bioquímicos pelo aumento de BCAAs Leu, Ileu e Val e seus correspondentes BCKAs. As concentrações médias no plasma de crianças saudáveis são 120, 63 e 220 para Leu, Ileu e Val, respectivamente²¹. Leu e seu cetoácido KIC são considerados os principais metabólitos relacionados com neurotoxicidade na doença e o aumento das concentrações plasmáticas destes compostos está associado ao aparecimento de sintomas². Já existem relatos que o dano cerebral tem sido relacionado a desmielinização^{3,8,22}, redução na captação cerebral de aminoácidos essenciais²³, apoptose neuronal²⁴ e aumento da produção da espécies reativas em estudos em modelo animal e em pacientes MSUD^{24,25,26,27,28,29}.

A terapia dietética em pacientes MSUD visa reduzir rapidamente os metabólitos tóxicos, restringindo os níveis de BCAAs da dieta a quantidades que permitam aos indivíduos atingir e manter concentrações plasmáticas de aminoácidos de BCAAs dentro das faixas de tratamento alvo, reduzir o catabolismo, promover o anabolismo, monitorar o estado nutricional e alterar a ingestão para promover o crescimento normal, desenvolvimento e manutenção da saúde. Para tanto, a dieta de pacientes com MSUD deve ser restrita em alimentos altamente proteicos, como carnes, ovos, leguminosas, leites e derivados e suplementada com fórmula metabólica especial isenta de BCAAs para que sejam supridas as necessidades proteicas e energéticas da criança. Esta dieta restrita e severa torna-se o principal fator pela falta de adesão do paciente ao tratamento³⁰. Assim, terapêuticas alternativas e inovadoras para a MSUD vêm sendo testadas afim de melhorar a adesão do paciente.

O transplante hepático tem sido utilizado no tratamento de pacientes com MSUD, sendo capaz de normalizar os níveis plasmáticos de BCAAs, aumentando a tolerância à leucina em mais de dez vezes. A taxa de sobrevivência tem sido próxima a 100% com observada estabilização no quadro clínico do paciente, mas sem reversão do dano cerebral³¹. Herden et al.³² recentemente relataram o primeiro caso de transplante dominó (esta prática consiste nos transplantes simultâneo entre três pessoas ou mais, normalmente um falecido e dois vivos) onde foram necessários apenas um fígado de paciente em óbito e outras três pessoas simultaneamente se beneficiaram deste enxerto, sendo umas delas, paciente MSUD. O paciente MSUD doador, antes do transplante possuía concentrações plasmáticas de Leu, Ileu e Val muito elevados sendo a de Leu 646,2 $\mu\text{mol/L}$. Após nove meses do transplante e sem

utilização de dieta restritiva, a concentração de Leu reduziu para 194,2 $\mu\text{mol/L}$ neste paciente, mantendo-se levemente elevada, mas de forma estável. Os demais pacientes mantiveram seus níveis de Leu dentro da faixa de normalidade e não sofreram nenhuma complicação devido ao enxerto. Em pacientes com curso grave da doença e não responsivos a dieta, o transplante dominó mostrou ser uma estratégia de tratamento com resultados muito satisfatórios, embora seja um tratamento muito recente, invasivo e que exige altos investimentos ³².

O ácido fenilbutírico, já aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) quando utilizado na forma de fenilbutirato de sódio (NaPBA) já mostrou ser eficaz no tratamento de hiperamonemia em pacientes com distúrbios relacionados a EIM do ciclo da uréia, onde visam, juntamente com dieta restrita de proteínas, reduzir os níveis de nitrogênio no organismo, fornecendo uma via alternativa para excreção deste metabólito³³. O NaPBA, um pró-fármaco, é metabolizado no composto ativo fenilacetato. O fenilacetato conjuga-se com a glutamina via reação de acetilação para formar o produto fenilacetilglutamina, que é excretado pelos rins, fornecendo um mecanismo alternativo para a excreção de nitrogênio residual ³⁴.

Estudos recentes demonstram que a utilização de NaPBA parece reduzir seletivamente os níveis de BCAA, ao passo que não altera os níveis de outros aminoácidos essenciais³⁵. Burrage et al.³⁶ em um estudo colaborativo e multicêntrico do Consórcio dos Transtornos do Ciclo da Ureia, avaliaram o tratamento com fenilbutirato de sódio em 553 pacientes com distúrbios do ciclo da uréia e concluíram que este pró-fármaco reduz os níveis plasmáticos de BCAAs, mas o mecanismo pelo qual ocorre essa redução não foi esclarecido³⁶. Estes resultados vão de encontro aos achados neste trabalho no qual foi verificado diminuição plasmáticas de Leu, Ileu e Val no modelo animal crônico de MSUD.

Em um estudo de caso envolvendo descrição de um paciente com descompensação metabólica na fase aguda da MSUD, onde por dificuldades técnicas, procedimentos extracorpóreos não estavam disponíveis (diálise peritoneal e hemofiltração), a utilização de NaPBA foi eficaz na diminuição dos níveis de BCAAs e diminuição de sintomas neuropsicomotores³⁷.

Brunetti-Pierri et al.⁹ investigaram o potencial tratamento com fenilbutirato para reduzir o BCAA e seus correspondentes BCKA em pacientes com formas clássicas intermediária de início tardio da MSUD. Descobriram que os níveis de BCAAs e o BCKAs foram significativamente reduzidos após terapia com fenilbutirato em indivíduos controles e em pacientes com MSUD intermediária de início tardio. O tratamento *in vitro* com fenilbutirato em fibroblastos e linfoblastos do controle resultou num aumento da atividade enzimática residual de BCKAD, enquanto o tratamento de células MSUD resultou em respostas diversas que não foi capaz de prever a resposta bioquímica nos pacientes. O fenilbutirato *in vivo* aumenta a proporção da enzima hepática ativa e a forma não fosforilada sobre a forma fosforilada inativa da subunidade E1 α do BCKDC. Após a utilização de enzimas recombinantes, estes autores demonstraram que o fenilbutirato previne a fosforilação de E1 α pela inibição da BCKDC quinase para ativar a atividade global do BCKDC. Estes experimentos fornecem uma explicação molecular para o efeito do fenilbutirato em pacientes MSUD⁹. Neste artigo, Brunetti-Pierri et al.⁹ indagam sobre a necessidade de se testar este tratamento a longo prazo em

pacientes com MSUD, o que pretendemos fazer no futuro em nosso grupo de pesquisa. Nosso experimento animal em modelo crônico de MSUD, com tratamento de 15 dias, forneceu resultados que corroboram com os achados obtidos por Brunetti-Pierri et al.⁹ nos níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada. Além disso, demonstramos diferente destes autores, que o fenilbutirato na forma nanoparticulada pode ser benéfico a pacientes portadores de MSUD, uma vez que poderia levar a uma redução substancial dos níveis cerebrais dos BCCAs, conferindo neuroproteção as graves manifestações neurológicas que acometem esses pacientes

Nossos resultados demonstraram que houve diminuição estatisticamente significativa dos BCAAs no plasma de animais MSUD, ilustrando que o tratamento com nanopartícula de ácido fenilbutírico torna-se eficaz quando testado em ratos com modelo crônico da doença. Este resultado é bastante promissor, mas, entretanto, ainda deve ser testado em pacientes. Cabe salientar que o efeito de nanopartículas de ácido fenilbutírico nos níveis dos BCAAs no tecido cerebral de ratos submetidos ao modelo de MSUD será verificado em breve por nosso grupo de pesquisa, o que permitirá compreender se este composto terá a capacidade de reduzir as concentrações destes aminoácidos, em especial de Leu, a nível de sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

1. Lee JY, Chiong MA, Estrada SC, Cutiongco-De la Paz EM, Silao CLT, Padilla CD. Maple syrup urine disease (MSUD)—Clinical profile of 47 Filipino patients. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31(S2):281-285.
2. Chuang, D.T.; Shih, V.E. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver CR., Beaudt AL, Sly WL, Valle D, 8ª ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill.p. 1971-2005, 2001.
3. Treacy, E.; Clow, C.L.; Reade, T.R.; Chitayat, D.; Mamer, O.A.; Scriver, C.R. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino-, oxo- and hydroxyacids implications for treatment association with CNS dysmyelination. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1992;15:121-135.
4. Morton, D.H.; Strauss, K.A.; Robinson, D.L.; Puffenberger, E.G.; Kelley, R.I. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics.* 2002;109:999-1008.
5. Jardim, L.B.; Martins, C.S.; Pires, R.S.; Sanseverino, M.T.; Refosco, L.; Vieira, R.C., et al. Uma experiência terapêutica no manejo da doença da urina do xarope do bordo. *Jornal de Pediatria.* 1995;71:279-284.
6. Peinemann F, Danner, DJ. Maple syrup urine disease 1954-1993. *J Inherit Metab Dis.* 1994;17:3-15.
7. Quental, S.; Macedo-Ribeiro, S.; Matos, R.; Vilarinho, L.; Martins, E.; Teles, E.L., et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol. Genet. Metab.* 2008;94:148-56.
8. Snyderman, S.E.; Norton, P.M.; Roitman, E. Maple syrup urine disease with particular reference to diet therapy. *Pediatrics.* 1964;34:454-472.
9. Brunetti-Pierri, N.; Lanpher, B.; Erez, A.; Ananieva, E.A.; Islam, M.; Marini, J.C., et al. Phenylbutyrate therapy for maple syrup urine disease. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20:631-40.
10. Cuadrado-Tejedor, M.; Ricobaraza, A.L.; Torrijo, R.; Franco, R.; Garcia-Osta, A. Phenylbutyrate is a multifaceted drug that exerts neuroprotective effects and reverses the Alzheimer's disease-like phenotype of a commonly used mouse model. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19:5076-84.
11. Ricobaraza, A.; Cuadrado-Tejedor, M.; Pérez-Mediavilla, A.; Frechilla, D.; Del Río, J.; García-Osta, A. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34:1721-32.
12. Torchilin, V.P. Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000;11:S81–S91.

13. Kreuter, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001;47:65–81.

14. Gelperina, S.; Maksimenko, O.; Khalansky, A.; Vanchugova, L.; Shipulo, E.; Abbasova, K., et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J PharmBiopharm.* 2009;74: 157-63.

15. Pardridge WM. Molecular Trojan Horses for blood-brain barrier drug delivery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;5:494-500.

16. De Campo L.; Yagmur, A.; Sagalowicz, L.; Leser, M.E.; Watzke, H.; Glatter, O. Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid systems. *Langmuir.* 2004;20:5254-5261.

17. Kumar, M.K.; Shah, M.H.; Ketkar, A.; Mahadik, K.R.; Paradkar, A. Effect of drug solubility and different excipients on floating behaviour and release from glyceryl monooleate matrices. *Int. J. Pharm.* 2004;272:151–160.

18. Bridi, R.; Fontella, F.U.; Pulrolnik, V.; Braun, C.; Zorzi, G.K.; Coelho, D., et al. A chemically induced acute model of maple syrup urine disease in rats for neurochemical studies. *J. Neurosci. Meth.* 2006;155:224–230.

19. Mescka C.P., Rosa A.P., Schirmbeck G., da Rosa T.H., Catarino F., de Souza L.O., et al. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. 2016;53:6007-6017.

20. Joseph, M.H.; Marsden, C.A. Amino acids and small peptides, in: C.F. Lim (Ed.), *HPLC of Small Peptides*. IRL Press: Oxford, 1986.

21. Marchini, J.S.; Moriguti, J.C.; Padovan, G.J.; Nonino, C.B.; Vianna, S.M.L.; Oliveira, J.E.D. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. *Medicina*, v.31, n.1, p.22-30, 1998.

22. Tribble, D.; Shapira, R. Myelin proteins: degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1983;114:440-446.

23. Araújo, P.; Wassermann, G.F.; Tallini, K.; Furlanetto, V.; Vargas, C.R.; Wannmacher, C.M.D., et al. Reduction of large neutral amino acid level in plasma and brain of hyperleucinemic rats. *Neurochem. Int.* 2001;38:529-537.

24. Jouvot, P.; Rustin, P.; Taylor, D.L.; Pocock, J.M.; Felderhoff-Mueser, U.; Mazarakis, N.D., et al. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol. Biol. Cell.* 2000;11:1919-1932.

25. Mescka, C.; Moraes, T.; Rosa, A.; Mazzola, P.; Piccoli, B.; Jacques, C., et al. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab. BrainDis.* 2011;26:21-8.
26. Scaini, G.; Jeremias, I.C.; Morais, M.O.; Borges, G.D.; Munhoz, B.P.; Leffa, D.D., et al. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol. Genet. Metab.* 2012;106:169-74.
27. Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Oliveira, M.H.; Haeser, A.; Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with Maple Syrup Urine Disease. *Metab. BrainDis.* 2006;21:279–286.
28. Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Barden, A.T.; Schmitt, G.O.; Dutra-Filho, C.S., et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2007;25:335–338.
29. Barschak, A.G.; Sitta, A.; Deon, M.; Barden, A.T.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M., et al. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *MetabBrainDis.* 2008;23:71-80.
30. Martins, A.M. *Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica.* 2ª ed., São Paulo; 2003.
31. Mazariegos, G.V. et al. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *J Pediatr.* 2011; 160:116 – 121.
32. Herden U., Li J., Fischer L., Brinkert F., Blhom M., Santer R., et al. The first case of domino-split-liver transplantation in maple syrup urine disease. *Pediatr Transplant.*2017;6:12993.
33. Burlina AB, Ogier H, Korall H, Trefz FK. Long-term treatment with sodium phenylbutyrate in ornithine transcarbamylase-deficient patients. *Mol GenetMetab.* 2001;72:351–355.
34. Brusilow SW. Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. *Pediatr Res.* 1991;29:147–150.
35. Scaglia, F., Carter, S., O'Brien WE, Lee B. Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients. *Mol GenetMetab.* 2004;1:S79-85.
36. Burrage, L.C, Jain, M., Gandolfo, L., Lee, B.H., Nagamani, S.C.S. Sodium Phenylbutyrate Decreases Plasma Branched-Chain Amino Acids in Patients with Urea Cycle Disorders. *Mol GenetMetab.* 2014;113(0): 131–135.
37. Köse, M., Canda, E., Kagnici, M., Uçar, S. K., Çoker, M. A Patient with MSUD: Acute Management with Sodium Phenylacetate/ Sodium Benzoate and Sodium Phenylbutyrate. *Case Rep Pediatr.* 2017; 2017: 1045031.

APENDICE A - FIGURAS

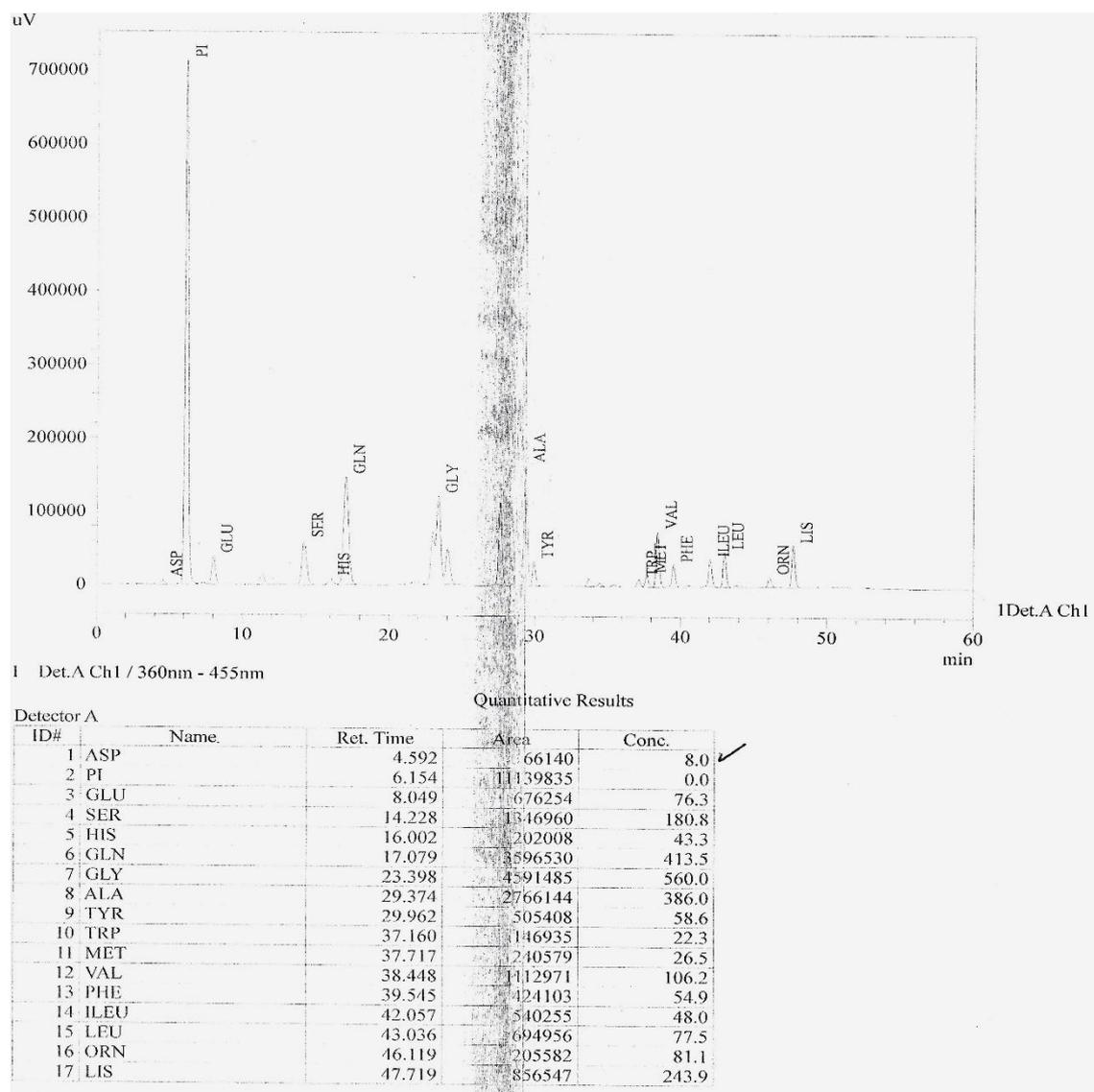


Figura 1: Cromatograma de plasma de rato controle submetido ao modelo crônico de MSUD. A análise foi realizado usando uma coluna de fase reversa (ODS 25 cm × 4,6 mm × 5 μm) e detecção fluorescente após a pré-coluna, derivatização com OPA (5,4 mg OPA em 1 mL de sódio 0,2 M borato, pH 9,5) mais 4% de mercaptoetanol. O fluxo foi ajustado para 1,4 mL/min em um gradiente da fase móvel de metanol e tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 5,5 (tampão A, 80% de metanol; tampão B, 20% de metanol). Corrida de 45 min.

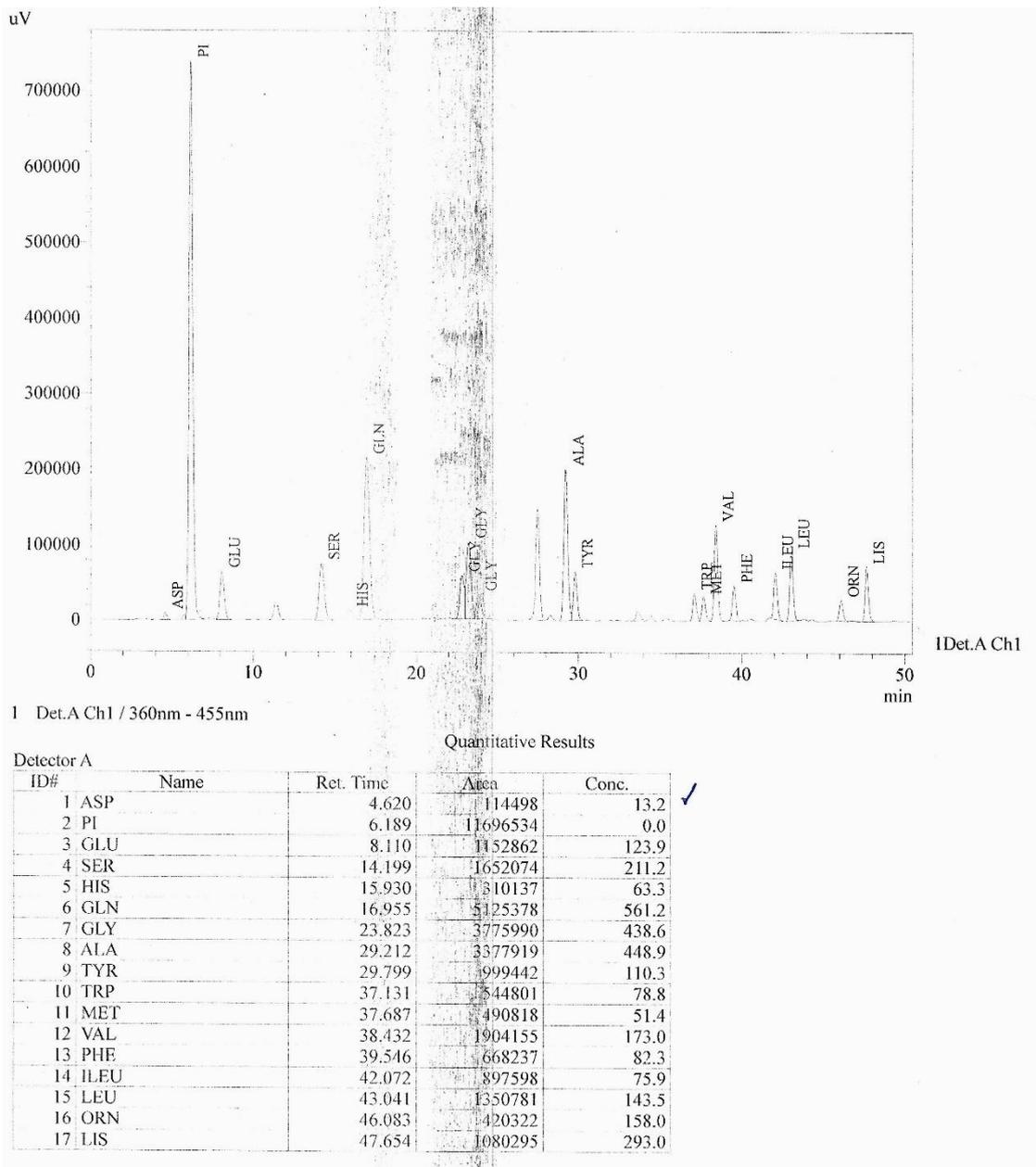


Figura 2: Cromatograma de plasma de rato MSUD submetido ao modelo crônico de MSUD. A análise foi realizado usando uma coluna de fase reversa (ODS 25 cm × 4,6 mm × 5 μm) e detecção fluorescente após a pré-coluna, derivatização com OPA (5,4 mg OPA em 1 mL de sódio 0,2 M borato, pH 9,5) mais 4% de mercaptoetanol. O fluxo foi ajustado para 1,4 mL/min em um gradiente da fase móvel de metanol e tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 5,5 (tampão A, 80% de metanol; tampão B, 20% de metanol). Corrida de 45 min.

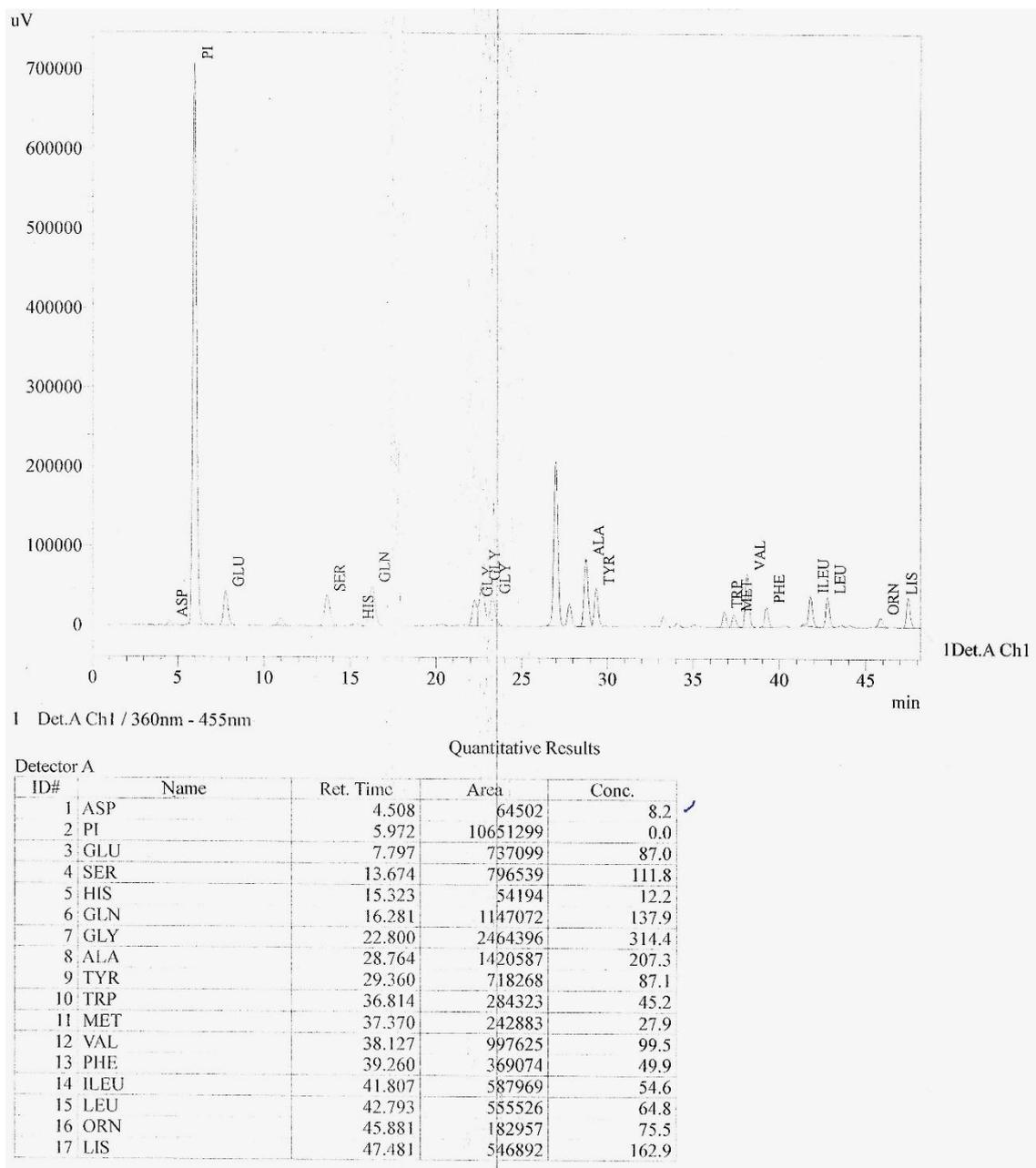


Figura 3: Cromatograma de plasma de rato Nano submetido ao modelo crônico de MSUD. A análise foi realizado usando uma coluna de fase reversa (ODS 25 cm × 4,6 mm × 5 μm) e detecção fluorescente após a pré-coluna, derivatização com OPA (5,4 mg OPA em 1 mL de sódio 0,2 M borato, pH 9,5) mais 4% de mercaptoetanol. O fluxo foi ajustado para 1,4 mL/min em um gradiente da fase móvel de metanol e tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 5,5 (tampão A, 80% de metanol; tampão B, 20% de metanol). Corrida de 45 min.

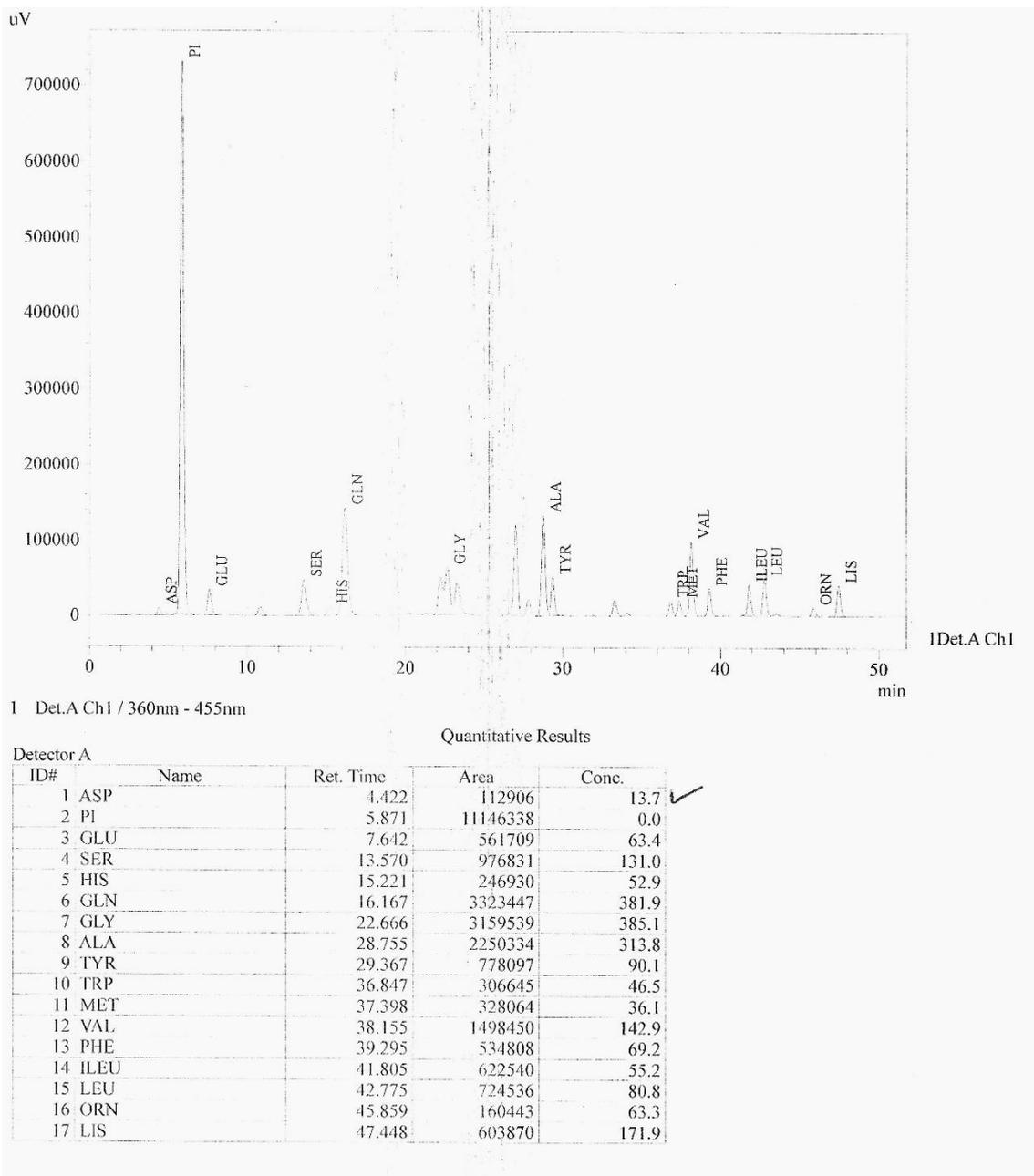


Figura 4: Cromatograma de plasma de rato Nano + MSUD submetido ao modelo crônico de MSUD. A análise foi realizado usando uma coluna de fase reversa (ODS 25 cm × 4,6 mm × 5 µm) e detecção fluorescente após a pré-coluna, derivatização com OPA (5,4 mg OPA em 1 mL de sódio 0,2 M borato, pH 9,5) mais 4% de mercaptoetanol. O fluxo foi ajustado para 1,4 mL/min em um gradiente da fase móvel de metanol e tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 5,5 (tampão A, 80% de metanol; tampão B, 20% de metanol). Corrida de 45 min.

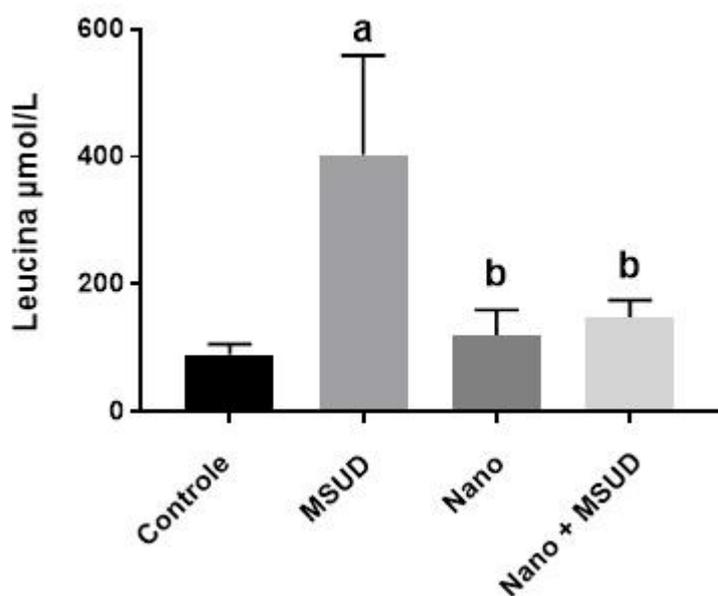


Figura 5: Efeito da administração de nanopartícula de ácido fenilbutírico (50 mg/kg) sobre os níveis de leucina (Leu) em plasma de ratos submetidos ao modelo crônico de MSUD. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$). (a) $p<0.05$ comparado ao grupo controle e (b) $p<0,05$ comparado ao grupo MSUD (ANOVA seguido de Tukey para múltipla comparação).

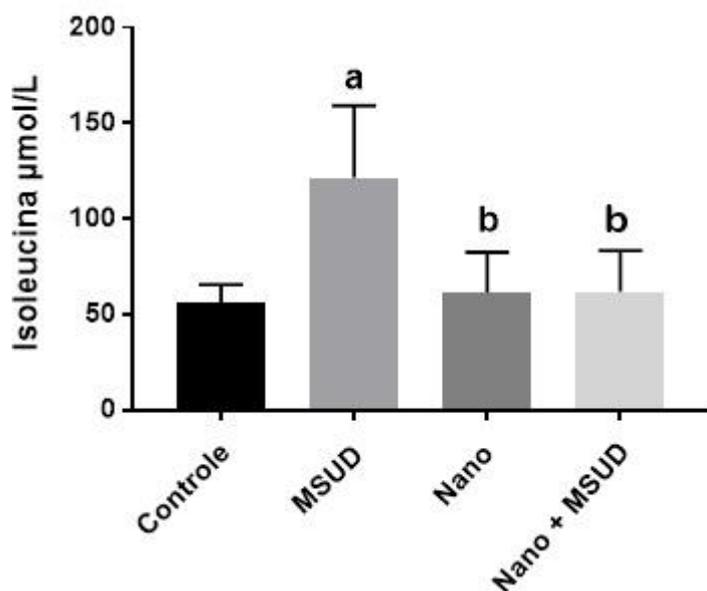


Figura 6: Efeito da administração de nanopartícula de ácido fenilbutírico (50 mg/kg) sobre os níveis de isoleucina (Ile) em plasma de ratos submetidos ao modelo crônico de MSUD. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$). (a) $p<0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p<0,05$ comparado ao grupo MSUD (ANOVA seguido de Tukey para múltipla comparação).

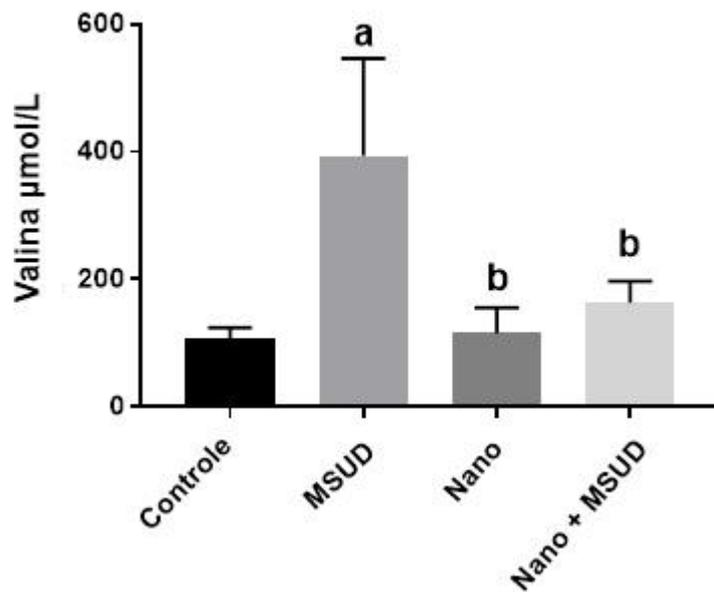


Figura 7: Efeito da administração de nanopartícula de ácido fenilbutírico (50 mg/kg) sobre os níveis de valina (Val) em plasma de ratos submetidos ao modelo crônico de MSUD. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$). (a) $p<0,05$ comparado ao grupo controle e (b) $p<0,05$ comparado ao grupo MSUD (ANOVA seguido de Tukey para múltipla comparação).

ANEXO 1 – NORMAS PARA A REVISTA

Instruções para autores

Política:

A Pesquisa Clínica e Biomédica (CBR), anteriormente “Revista HCPA”, é uma publicação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Escola de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED / UFRGS). É um periódico científico de livre acesso que visa publicar artigos de todas as áreas relevantes nas Ciências da Saúde, incluindo clínica e pesquisa básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais das revistas.

A CBR apóia as políticas para o registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] e o Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Portanto, o CBR somente aceitar artigos de pesquisa clínica que tenham recebido um número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] ou outro banco de dados oficial dedicado ao registro de ensaios clínicos.

Todos os artigos publicados são revisados por pares de maneira duplamente cega. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, seus direitos autorais são automaticamente transferidos para o periódico. O conteúdo dos manuscritos submetidos para publicação no CBR implica que ele não tenha sido publicado anteriormente e que não foi submetido a outro periódico. Para ser publicado em outros lugares, mesmo em parte, os artigos publicados em CBR requerem aprovação dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos documentos são de inteira responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser escritos em português, inglês ou Espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores.

O manuscrito deve se encaixar em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, como segue:

FORMULÁRIO E PREPARAÇÃO DE ARTIGOS

As seguintes categorias de contribuições serão consideradas para publicação

Editorial:

Revisão crítica e minuciosa, preparada a convite dos editores, e submetida por um autor com renomados conhecimentos sobre o assunto. Editoriais podem ter até 1.000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação do periódico, assinado pelo editor, além de editoriais especiais que compreendem colaborações solicitadas sobre temas ou sobre artigos publicados no Jornal.

Artigos de Revisão:

Artigos que visam sintetizar e avaliar criticamente o conhecimento atual sobre tema particular. Eles não devem conter mais de 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar um resumo não estruturado, com no máximo 200 palavras (exceto: revisões sistemáticas - ver estrutura abstrata em “Artigos Originais”) e uma lista, mas de preferência com não mais de 80 referências. As tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e os números devem ser enviados como documentos adicionais em arquivos individuais.

Artigos especiais:

Manuscritos solicitados exclusivamente pelos editores, sobre assunto de relevância científica, a autores com expertise reconhecida na área, e que não atendam aos critérios de Editoriais.

Artigos Originais:

Artigos com resultados de pesquisa não publicados, incluindo estudos completos que contenham informações relevantes para que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. Sua estrutura formal deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. As conclusões devem ser no último parágrafo da Discussão, não exigindo uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser mencionadas. Para artigos originais, um resumo estruturado deve ser apresentado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) em Português e Inglês, nos casos em que o artigo não é escrito inteiramente em inglês. Os resumos (Português, espanhol ou inglês) não deve exceder 250 palavras.

Artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídos no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras enviadas como um documento adicional em arquivos individuais.

Relatos de casos:

Artigos baseados em casos peculiares e breves comentários sobre a importância do caso em relação ao conhecimento existente no campo. Eles devem conter até 1.000 palavras, com um total de não mais que duas tabelas ou figuras e 15 referências, uma vez apresentando a revisão de literatura não é o propósito dos relatórios.

Sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso; Apresentação do caso (Relato de Caso) e Discussão. Relatos de casos devem descrever descobertas novas ou incomuns, ou oferecer novos insights sobre problema. O conteúdo deve ser limitado a fatos relevantes para o caso. O confidencialidade em relação à identificação do paciente é fundamental, por isso os autores não devem relatar quaisquer datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação irrelevante para o caso, mas que pode possivelmente identificar o paciente.

Os relatórios de caso devem ter um resumo não estruturado com no máximo 150 palavras.

As tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após referências) e figuras deve ser enviado como documentos adicionais em arquivos individuais.

Relatos de Casos: Imagens em Medicina

Secção dedicada à publicação de imagens informativas, que são incomuns e / ou de amplo interesse em situações clínicas. Não deve conter mais de 500 palavras e um total de 5 referências. Duas a três imagens (com resolução de pelo menos 300 dpi).

Cartas:

Pareceres e comentários sobre um artigo publicado na Revista, sobre temas de interesse científico, relevância, e / ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser conciso, sem mais de 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas, e um máximo de cinco referências. Eles não devem ter um resumo.

Comunicação Breve:

Comunicações breves são resultados de pesquisa originais, mas preliminares ou mais específicos contenham todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante ao original artigos; no entanto, os resumos (português, espanhol ou inglês) não devem exceder 150 palavras e o texto não devem exceder 1.200 palavras. Um máximo de dois Tabelas / figuras são aceitos.

Apêndice:

Além de edições regulares, a CBR publica o apêndice da Semana de Ciência do HCPA.

CONFLITOS DE INTERESSE

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações financeiras ou pessoais que poderia influenciar de forma inadequada o seu julgamento profissional. Essas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis para um papel e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem divulgar possíveis conflitos de interesse e devem ser feitos no momento da submissão do manuscrito.

É a critério do editor decidir se essa informação deve ser publicada ou não e se deve usá-lo para decisões editoriais. Uma forma comum de conflito de interesse é o financiamento de pesquisas de terceiros que podem ser empresas, órgãos governamentais ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados tendenciosos, influenciando inadequadamente (enviesamento) seu trabalho. Os autores devem descrever a interferência da entidade financiadora em qualquer etapa da

pesquisa, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre o patrocinador e o autor. Os autores podem optar por informar os nomes dos revisores para os quais seu artigo não deve ser enviado, justificando-se.

PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE

Informações e fotos de pacientes que permitam sua identificação devem ser publicado com autorização formal por escrito do paciente, e somente quando necessário para o propósito do estudo. Para autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e estar ciente de que este artigo pode ser disponibilizado na Internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificar um paciente, como no caso de fotos com listras sobre os olhos, uma autorização formal deve ser obtida. No caso de distorção de dados para impedir a identificação, os autores e editores devem que tais distorções não comprometem os resultados do estudo.

EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS

Todo o conteúdo relacionado à pesquisa com seres humanos e animais deve ter aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Pesquisa ou pelo Comitê de Ética em Animais, respectivamente. Os trabalhos devem estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia (atual ou atualizada), a Resolução CNS n. 466/2012 e suas complementares regulamentos, bem como a Lei n. 11.794 / 2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comitê Ético, bem como no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, se aplicável.

PREPARAÇÃO DO ARTIGO

O registro no sistema como autor e posterior acesso com login e senha são obrigatórias para enviar e verificar o status dos envios.

Identificação: deve incluir: a) Título do artigo, claro e conciso. Não use abreviaturas. Deve haver uma versão do título reduzido para aparecer no cabeçalho bem como um título no idioma Inglês; b) nome completo dos autores; c) Instituição e o sector ou unidade da instituição a que cada um dos autores é filiado (títulos pessoais e cargos ocupados não devem ser mencionados); d) Indicação do autor correspondente, acompanhado do endereço eletrônico; e) Se tiver sido apresentado em um laboratório científico reunião, o nome do evento, o local ea data de conclusão devem ser indicado.

OS NOMES DE TODOS OS AUTORES DO MANUSCRITO DEVEM SER INDICADOS NO SISTEMA

Resumo e palavras-chave: Os artigos devem ter um resumo em inglês. Verificando a estrutura e número de palavras descritas para cada tipo específico de artigo (ver acima). Os resumos estruturados, necessários apenas para artigos originais, devem apresentar o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo no início de cada parágrafo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave - expressões que representam o assunto do artigo - deve ser em número de 3 a 10, fornecido pelo autor, com base no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma

tradução da MeSH (Medical Subject Headings) da National Library of Medicine, disponível em o seguinte endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

Manuscrito: deve estar de acordo com a estrutura requerida para cada categoria de artigo. Citações de texto e referências citadas nas legendas de tabelas e figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos. As referências devem ser citadas no texto como no exemplo: Referência¹

Tabelas: devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem que eles foram citados no texto e encabeçados por um título adequado. Eles devem ser citados no texto, mas a informação duplicada deve ser evitada. As tabelas, com títulos e notas de rodapé, devem ser autoexplicativas. As abreviaturas devem ser especificadas como notas de rodapé sem indicação numérica. As notas de rodapé restantes devem ser numeradas em algarismos arábicos e escritos em sobrescrito.

Figuras e gráficos: Ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas artigos separados, em formato JPG (em alta resolução - pelo menos 300 dpi). Eles devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, no outro são citados no texto e deve ser suficientemente claro para a reprodução e na mesma língua que o texto. Fotocópias não serão aceitas. Se houver figuras extraídas de outros estudos anteriormente publicados, os autores devem fornecer uma permissão por escrito para reprodução. Esta autorização acompanhará os manuscritos submetidos para publicação. As figuras devem ter um título e subtítulo (se necessário), o que deve preceder a figura em si.

Abreviaturas: as abreviaturas devem ser explicadas na primeira menção. No resto do artigo, não é necessário repetir o nome completo.

Nome dos medicamentos: o nome genérico deve ser usado.

No caso de citar aparelhos / equipamentos: todos os aparelhos / equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

Agradecimentos: deve incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que contribuíram para o estudo, mas cujas contribuições não justificam sua inclusão como autores; este item deve incluir também os agradecimentos por apoio, assistência técnica, etc. Este item deve vir antes das referências.

Conflitos de interesse: Se houver algum conflito de interesse (veja acima), deve ser declarado. Caso não haja, coloque nesta seção: "Os autores declaram não haver conflitos de interesse"

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na hora em que são mencionados no texto e identificados com algarismos arábicos. A apresentação deve ser baseado em um formato chamado "Vancouver Style", como os exemplos abaixo, e os títulos de periódicos devem ser abreviados de

acordo com o estilo apresentado pela Lista de Periódicos. Indexado em Index Medicus, da National Library of Medicine, disponível em: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. Os autores devem garantir que as referências citadas no texto apareçam na lista de referências com datas exatas e nomes dos autores escritos corretamente. A precisão das referências é responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, artigos não publicados ou inacabados podem ser citados quando absolutamente necessário, mas não deve ser incluído na lista de referência e citado apenas no texto. A submissão dos trabalhos inéditos mencionados no manuscrito pode ser solicitada a critério dos editores.

Exemplos de referências de citações:

Artigos de revistas (de um a seis autores)

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que faz os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Artigos de revistas (mais de seis autores)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K., Zink M, Windus D, et al. Cálcio carbonato como aglutinante de fosfato em pacientes com insuficiência renal crônica diálise. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

Artigos sem o nome do autor

Câncer na África do Sul [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

Livros

Ringsven MK, Bond D. Gerontologia e habilidades de liderança para enfermeiros. 2ª ed. Albany (NY): Editores Delmar; 1996.

Capítulos de um livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hipertensão e acidente vascular cerebral. In: Laragh JH, Brenner BM, editores. Hipertensão: fisiopatologia, diagnóstico e manejo. 2ª ed. Nova Iorque: Raven Press; 1995. p.465-78

Livros em que editores (organizadores) são autores

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Cuidados de saúde mental para pessoas idosas. Nova York: Churchill Livingstone; 1996.

Teses

Kaplan SJ. Cuidados de saúde domiciliar pós-hospitalar: o acesso e a utilização do idoso [dissertação]. St. Louis (MO): Unidade de Washington; 1995.

Artigos apresentados em conferências

Bengtsson S, Solheim BG. Aplicação da proteção de dados, privacidade e segurança em informática médica. Em: Lun KC, Degoulet P, TE Piemme, Rienhoff O, editores. MEDINFO 92. Anais do 7º Congresso Mundial de

Informática Médica; 6-10 de setembro de 1992; Genebra, Suíça. Amesterdão: Holanda do Norte; 1992. p. 1561-5.

Artigos de jornal eletrônico

Morse SS. Fatores no surgimento de doenças infecciosas. EmergInfectDis [serial infect online] 1995 Jan-Mar [citado 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 telas]. Disponível a partir de: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Outros tipos de referência devem seguir o documento:

Exigências uniformes do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE) para Manuscritos

Submetido a Revistas Biomédicas: Referências de Amostra

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Requerimentos técnicos

Documento do Microsoft Word (.doc ou .rtf), espaço individual, tamanho da fonte 12, margens de 2 cm cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas, e as figuras devem ser enviadas em jpg ou tiff em uma resolução de pelo menos de 300 dpi.