

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Perfil clínico e laboratorial de pacientes portadores de Desordens do Ciclo da Ureia: a importância da hiperamonemia

Franciele Fátima Lopes

Porto Alegre, dezembro de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Perfil clínico e laboratorial de pacientes portadores de Desordens do Ciclo da Ureia: a importância da hiperamonemia

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Farmacêutica.

Franciele Fátima Lopes

Orientadora: Prof. Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, dezembro de 2019.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Carmen Regla Vargas, por ter me dado a oportunidade de conhecer a pesquisa ao me inserir na iniciação científica e por todo o incentivo e confiança depositados em mim. Tu és inspiração para mim e para todos os alunos que querem continuar na ciência ou querem se tornar professores, mesmo em tempos difíceis de se fazer isso no Brasil. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também às farmacêuticas bioquímicas do LAM, Angela e Dani, pela paciência que tiveram comigo durante esses anos como bolsista, me ensinando sobre as técnicas e a rotina do laboratório e também pela amizade.

Agradeço às minhas colegas de bolsa, Vitória e Bianca, pela cumplicidade e companheirismo, vou sentir muita saudade de passar as tardes com vocês, nos dividindo entre o CG e as acilcarnitinas e torcendo para não ter acabado o tampão da fase móvel...

Agradeço aos meus grandes amigos, Thamires, Grazi, Marina, Aline, Gilberto e Nati por tornarem meus dias de faculdade mais divertidos, seja pelas risadas ou por alguns choros ocasionais e por sempre estarem presente, mesmo alguns já enfrentando a vida atarefada de formado.

E em especial, agradeço à minha família por sempre acreditar no meu potencial, me incentivando e me dando suporte durante todos estes anos. Aos meus irmãos Helen, Lana, Kerlyn e Taryky, e aos meus amados pais, Oneide e Vanderlei, obrigada por tantas vezes me colocarem em primeiro lugar, fazendo o possível e o impossível para que eu pudesse concluir essa jornada, vocês são tudo para mim!

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

RESUMO

Introdução: As Desordens do Ciclo da Ureia (DCU) são um grupo de doenças genéticas causadas por deficiências nas enzimas envolvidas no ciclo da ureia, o qual é responsável pela detoxificação de amônia no organismo humano. O mau funcionamento do ciclo resulta em um acúmulo de amônia, ocorrendo um quadro de intoxicação por hiperamonemia. **Objetivo:** Descrever e analisar as características clínicas e laboratoriais de pacientes diagnosticados com DCU no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de janeiro de 2001 até julho de 2019. **Métodos:** Foi realizada a análise de prontuários dos pacientes, assim como as dosagens de amônia sanguínea e dosagem de ácido orótico na urina. A análise de ácidos orgânicos na urina foi realizada por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, e a análise de aminoácidos no sangue por cromatografia líquida de alta pressão e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em tandem. **Resultados:** Foram encontrados 24 pacientes com DCU dentre 588 indivíduos diagnosticados com erros inatos do metabolismo, a maioria no período neonatal, com uma maior frequência de casos de deficiência de OTC (8) e citrulinemia tipo I (8), seguidos de argininemia (5), deficiência de CPS1 (2) e acidemia argininosuccínica (1). Os sintomas clínicos demonstraram-se altamente severos, sendo em sua grande maioria neurológicos como convulsões e coma, e atrasos no desenvolvimento, além de uma elevada taxa de óbitos. A análise laboratorial revelou hipoglicemia e acidose metabólica em grande parte dos casos, assim como hiperamonemia e elevada excreção de ácido orótico na urina (exceto em casos de deficiência de CPS1). O perfil de aminoácidos nos pacientes revelou-se bem característico e o de ácidos orgânicos foi bastante variável. **Conclusão:** Ressalta-se a importância da urgência na identificação do quadro clínico e a realização de exames laboratoriais para possibilitar o diagnóstico correto e assim aumentar as chances de sobrevivência e minimizar os danos neurológicos e psicomotores nos pacientes com DCU.

PALAVRAS CHAVES: Desordens do Ciclo da Ureia, hiperamonemia, Erros Inatos do Metabolismo.

ABSTRACT

Introduction: Urea Cycle Disorders (UCD) are a group of genetic diseases caused by deficiencies in the enzymes involved in the urea cycle, which is responsible for detoxification of ammonia in the human body. The dysfunction of the cycle results in an accumulation of ammonia, leading to hyperammonemia poisoning. **Objective:** To describe and to analyze the clinical and laboratorial findings of patients diagnosed with UCD at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from January 2001 to July 2019. **Methods:** The medical records were analyzed, as well as the blood ammonia and urinary orotic acid measurement. The urinary organic acids determination was performed by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry and the blood amino acid analysis by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results:** 24 patients were diagnosed with UCD among 588 individuals diagnosed with inborn errors of metabolism, most of them in the neonatal period, showing a higher frequency of cases of OTC deficiency (8) and citrullinemia type I (8), followed by argininemia (5), CPS1 deficiency (2) and

argininosuccinic aciduria (1). Clinical symptoms were highly severe, being the majority neurological such as seizures and coma, and developmental delays, besides a high death rate. Laboratory analysis revealed hypoglycemia and metabolic acidosis in most cases, as well as hyperammonemia and high excretion of orotic acid in the urine (except in cases of CPS1 deficiency). The amino acid profile on patients was very characteristic and the organic acids were quite variable. **Conclusion:** We emphasized the importance of urgency in the identification of the clinical condition and the laboratorial tests to enable the correct diagnosis in order to increase the chances of survival and minimize neurological and psychomotor damage of DCU patients.

KEYWORDS: Urea Cycle Disorders, hyperammonemia, Inborn Errors of Metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

DCU – Desordens do Ciclo da Ureia

NAGS - N-acetilglutamato sintase

CPS1 - carbamoil fosfato sintase 1

OTC - ornitina transcarbamilase

ASS1- argininosuccinato sintase

ASL - argininosuccinato liase

ARG1 - arginase 1

ORNT1- transportador de ornitina

CITRIN - transportador de citrina

CG - cromatografia gasosa

CG/MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

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

FDA - Food and Drug Administration

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVO	11
MÉTODOS	11
Dosagem de amônia sanguínea	11
Dosagem de creatinina na urina	11
Dosagem de ácido orótico na urina	11
Dosagem de aminoácidos em sangue por LC/MS/MS	12
Dosagem de aminoácidos em plasma por HPLC	12
Dosagem de ácidos orgânicos na urina por CG e CG/MS	12
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	14
REFERÊNCIAS	18
ANEXOS	21
Anexo 1: Tabelas e Figuras	21
Anexo 2: Normas da Revista	26

INTRODUÇÃO

As Desordens do Ciclo da Ureia (DCU) são Erros Inatos do Metabolismo causados por deficiências nas enzimas envolvidas no ciclo da ureia, o que conseqüentemente leva ao seu mau funcionamento. O ciclo da ureia (Figura 1) é responsável pela detoxificação de amônia no organismo humano, um metabólito tóxico largamente produzido resultante do catabolismo dos aminoácidos. A amônia é, então, metabolizada à ureia através de um mecanismo cíclico e enzimaticamente controlado que ocorre no fígado, sendo esta não-tóxica e excretada na urina. Caso a via de detoxificação da amônia esteja prejudicada, pode ocorrer um quadro de intoxicação decorrente de hiperamonemia, caracterizando as DCU.⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

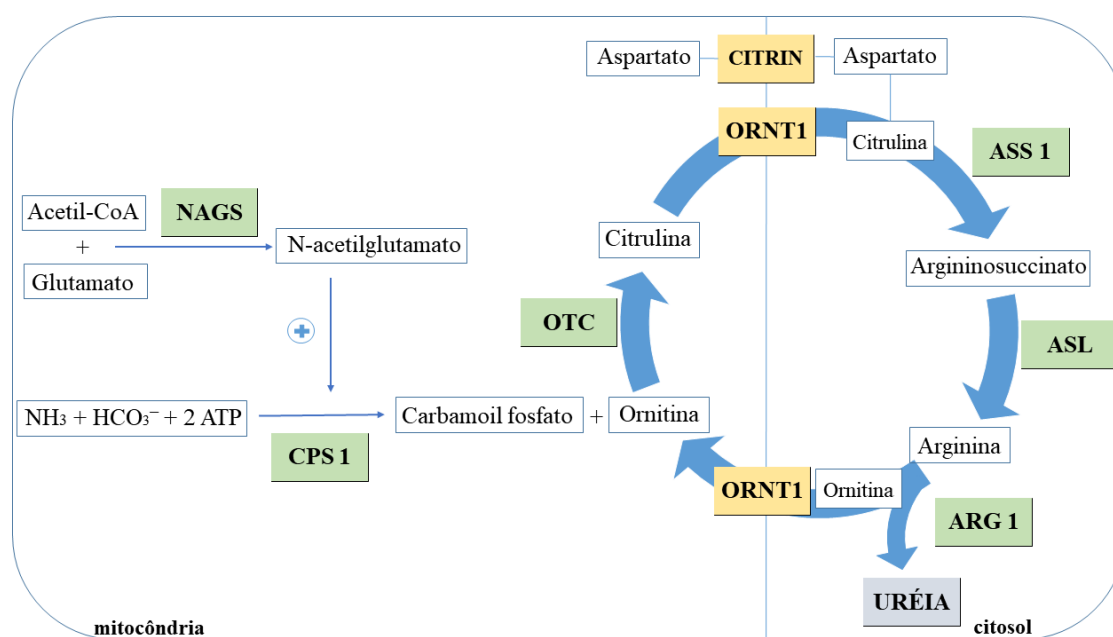


Figura 1. Ciclo da ureia. NAGS: N-acetilglutamato sintase; CPS1: carbamoil fosfato sintase 1; OTC: ornitina transcarbamilase; ASS1: argininosuccinato sintase 1; ASL: argininosuccinato liase; ARG 1: arginase 1; ORNT1: transportador de ornitina e CITRIN: transportador de citrina.⁽¹⁾

Nas DCU ocorre um defeito no gene decodificador em qualquer uma das seis enzimas e dos dois transportadores envolvidos no ciclo, são estes: N-acetilglutamato sintase (deficiência de NAGS), carbamoil fosfato sintase 1 (deficiência de CPS1), ornitina transcarbamilase (deficiência de OTC), argininosuccinato sintase (deficiência de ASS ou citrulinemia tipo 1), argininosuccinato liase (deficiência de ASL ou acidúria argininosuccínica), arginase 1 (deficiência de ARG1 ou argininemia), transportador de ornitina (deficiência de ORNT1) e transportador de citrina (citrulinemia tipo 2).⁽⁴⁾ Estas doenças possuem caráter autossômico recessivo (com exceção da deficiência de OTC, a qual possui herança ligada ao X) e sua prevalência estimada encontra-se entre 1:8000 e 1:35000 casos.⁽⁵⁾

As principais manifestações clínicas deste grupo de doenças provém da encefalopatia desencadeada pelo acúmulo de amônia sanguínea.⁽¹⁾ Pacientes em quadro agudo podem apresentar vômitos, falta de apetite progressiva, níveis alterados de consciência, convulsões e coma, um quadro clínico muito semelhante a sepse no caso de neonatos.⁽⁶⁾⁽⁷⁾ A apresentação crônica destas doenças geralmente é caracterizada pela

presença de danos cognitivos, psíquicos e intelectuais, comum em indivíduos diagnosticados tardiamente.⁽⁸⁾⁽⁹⁾ Entretanto, vale salientar que cada uma das desordens pode apresentar suas peculiaridades sintomáticas assim como possuir gravidade variável.⁽¹⁰⁾ A deficiência de OTC, por exemplo, o defeito do ciclo da ureia mais comum, é geralmente mais grave e letal em neonatos do sexo masculino devido ao seu caráter de herança ligado ao X.⁽¹¹⁾ Já a deficiência na enzima argininosuccinato liase (ASL) pode causar aumento da fragilidade na estrutura capilar (trichorrhexis nodosa), sendo esta uma alteração bastante específica desta deficiência.⁽¹²⁾

Após a observação dos sintomas e suspeita de diagnóstico de DCU, é essencial se realizar a dosagem da amônia sanguínea, a qual pode apresentar picos superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ em neonatos em quadro agudo. Entretanto, a ausência de uma hiperamonemia em pacientes adultos também não exclui a possível existência de uma DCU. Posteriormente são realizadas análises de aminoácidos no sangue, assim como devem ser investigados os níveis de ácido orótico e ácidos orgânicos na urina para um delineamento do quadro clínico laboratorial do paciente, observando-se o padrão metabólico como um todo.⁽⁸⁾⁽¹³⁾ Além disso, testes de atividade enzimática e análise de mutações podem ser realizados para fins confirmatórios.⁽⁶⁾ A maioria dos países não inclui, ou apenas inclui parcialmente as DCU em seus programas de triagem neonatal, pois, até o momento, apenas parte do grupo de doenças possui painel analítico validado, devido a baixa especificidade e sensibilidade de aminoácidos determinantes no diagnóstico como a citrulina e a glutamina. Além disso, a maioria dos pacientes com DCU, principalmente os neonatos em crise hiperamonêmica, necessitam de diagnóstico imediato, ainda nos primeiros dias de vida, o que não justificaria a necessidade de se aguardar pelos resultados de um teste de triagem neonatal.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

Assim que é feito o diagnóstico de alguma das doenças deste grupo, o paciente começa uma longa jornada terapêutica, que consiste em uma combinação de medicamentos e dieta hipoproteica. Neste caso, torna-se essencial o monitoramento do equilíbrio entre esta restrição dietética e a falta de nutrientes na dieta do indivíduo, fazendo-se necessária uma suplementação com fórmulas contendo aminoácidos e vitaminas para que assim seja evitada uma possível desnutrição e consequentes atrasos no desenvolvimento e crescimento dos pacientes. A administração de drogas *scavenger* é essencial tanto para o controle da hiperamonemia aguda quanto para a manutenção dos níveis de amônia no organismo à longo prazo. A terapia combinada de fenilacetato de sódio e benzoato de sódio, os quais por meio de conjugação com a glutamina e glicina, respectivamente, promovem a excreção da fenilacetilglutamina e do hipurato diretamente na urina, foram aprovados pelo FDA na década de 1980 e alguns anos depois um precursor metabólico do fenilacetato, o fenilbutirato, foi aprovado como monoterapia bem tolerada e segura para o tratamento das DCU.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

A grande inespecificidade de sintomas nas DCU, principalmente em neonatos, é o grande desafio para um diagnóstico precoce, diminuição da taxa de mortalidade e aumento de sobrevida dos pacientes.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi descrever as características clínicas e laboratoriais de pacientes diagnosticados com DCU no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para uma melhor elucidação destes perfis.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, retrospectivo e descritivo no qual foram incluídos todos os pacientes diagnosticados com alguma Desordem do Ciclo da Ureia no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de janeiro de 2001 à julho de 2019.

Através da análise de prontuários dos pacientes, foram coletados dados de caracterização (idade, sexo, data de nascimento, local de origem, consanguinidade), dados clínicos (características clínicas do paciente antes de ser feito o diagnóstico), dados laboratoriais (dosagem de amônia sanguínea, dosagem de ácido orótico na urina, dosagem de aminoácidos em sangue realizadas por HPLC e LC/MS/MS e dosagem de ácidos orgânicos na urina realizados por CG/MS) além de informações sobre o tratamento.

Os testes para o diagnóstico das DCU foram realizados no centro de referência em questão, conforme descrito abaixo:

Dosagem de amônia sanguínea

A dosagem de amônia sanguínea foi realizada utilizando-se kit comercial Multigent Ammonia Ultra para determinação enzimática quantitativa em plasma, no qual a amônia na presença de glutamato desidrogenase (GLDH), combina-se com α -cetoglutarato e NADH produzindo glutamato e NAD^+ . A diminuição da absorbância (NADH para NAD^+) em 340 nm é proporcional a concentração de amônia no plasma examinado. As reações e leituras das amostras foram realizadas utilizando-se o equipamento Architect C4000.

Dosagem de creatinina na urina

Previamente à realização da dosagem de ácido orótico e dosagem de ácidos orgânicos, foi realizada a correção do volume de urina necessário para cada paciente, a partir de seu respectivo valor de creatinina urinária. As dosagens da creatinina foram realizadas utilizando-se o método de Jaffé modificado para microplacas (kit comercial Labtest).

Dosagem de ácido orótico na urina

A partir da dosagem de creatinina específica de cada paciente, foi calculado um volume de urina equivalente a 200 mg de creatinina/L de urina. Este volume foi pipetado para tubos de vidro previamente identificados e adicionou-se água purificada até completar 1 mL. Concomitante a isto, foi preparada uma curva de calibração utilizando-se uma solução contendo ácido orótico 1 mg % em volumes crescentes e água (com volume total de 1 mL) juntamente a um branco de reação. Adicionou-se 2 mL de tampão citrato em todos os tubos (curva, testes e branco) e tampou-se. Após, foram adicionados 0,5 mL de água bromada nos tubos da curva e amostras (com exceção do branco de reação) e em seguida todos os tubos foram tampados,

homogeneizando-se e deixando-se em repouso por 1 min. Na etapa seguinte, foram adicionados 1 mL de ácido ascórbico 5% em todos os tubos, e então foi feita uma homogeneização seguida de uma incubação por 5 min à 40 °C sob agitação. Finalmente foram adicionados 2 ml de P-dimetilaminobenzaldeído (P-DABA) 2,5% a todos os tubos, agitando-se e incubando-se por 10min à 40 °C. As absorvâncias foram lidas em 480 nm por espectrofotômetro SpectraMax M2.⁽¹⁹⁾

Dosagem de aminoácidos em sangue por LC/MS/MS

Utilizando sangue total impregnado em papel filtro, foi realizada a análise de acilcarnitinas e aminoácidos por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas em tandem (LC/MS/MS). Um círculo de 3 mm de diâmetro foi recortado do papel filtro e transferido para um eppendorf, ao qual foram adicionados 100 µL da solução padrão de aminoácidos marcados com deutério (H²). Após, foi feita uma homogeneização por 30 min e o sobrenadante evaporado com nitrogênio a 50 °C. Na sequência, foram adicionados 60 µL de 3N HCl-butanol para a derivatização das amostras, que finalmente foram incubadas a 65 °C por aproximadamente 15 min. Foram utilizados 100 µL de matriz acetonitrila/água milliQ/ácido fórmico (50/50/0,1%) para diluição da amostra que passou por centrifugação, e finalmente 30 µL foram injetados no equipamento, que possuía fase móvel composta por acetonitrila/água milliQ/ácido fórmico (50/50/0,25%). As acilcarnitinas e aminoácidos foram analisados como butil-ésteres utilizando cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Quattro Micro MS/MS (Perkin Elmer). As temperaturas da fonte e de dessolvatação encontravam-se em 120 °C e 300 °C, respectivamente. As energias de entrada, de colisão e de saída foram de 3V, 16V, e 2V, respectivamente. Os aminoácidos foram monitorados por MRM (reação de monitoramento múltiplo), com scan do íon pai 85 (m/z) ou scan de perda neutra 102 (m/z). As concentrações foram determinadas pela resposta de cada analito em relação ao seu respectivo padrão interno. Os resultados foram reportados em µmol/L.⁽²⁰⁾

Dosagem de aminoácidos em plasma por HPLC

Os níveis de aminoácidos em plasma foram medidos através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, Shimadzu Corp.) utilizando coluna de fase reversa (ODS 25 cm x 4.6 mm x 5 µm). Primeiramente, foi realizada uma etapa de desproteinização da amostra, utilizando 200 µL de metanol e sequente centrifugação da mistura. O sobrenadante foi alíquotado e 40 µL foram adicionados à 10 µL de padrão interno (ácido homocisteico), juntamente com 50 µL de mercaptoetanol 4%. Na sequência, 200 µL de o-ftaldialdeído foram adicionados à mistura para derivatização. Por fim, 20 µL foram injetados no equipamento de HPLC e a detecção foi feita por fluorescência.⁽²¹⁾

Dosagem de ácidos orgânicos na urina por CG e CG/MS

Para análise de ácidos orgânicos, foram adicionados 100 µl de cada um dos dois padrões internos (hexadecano e ácido heptadecanóico) às amostras de urina, as quais tiveram seu volume corrigido previamente, de acordo com o valor de creatinina de cada paciente. Esta mistura foi acidificada até atingir faixa de pH entre 0,5-1,0. Um volume de 250 µl de cloreto de amônio foi então adicionado à mistura e a extração realizada com 2,5 mL de acetato de etila. Após homogeneização e centrifugação, a fase orgânica (superior) foi coletada e realizou-se uma segunda extração. As fases orgânicas foram reunidas e 0,5 g de sulfato de sódio anidro adicionados, permanecendo em repouso por pelo menos uma hora. Após filtração em membrana de celulose, foi realizada a

evaporação das amostras em nitrogênio à 60 °C. Cem µL de etanol absoluto foram utilizados na diluição, sendo a amostra homogeneizada e centrifugada por 10 min à 2000 rpm, ocorrendo uma última evaporação em nitrogênio à 60 °C. Para a derivatização da amostra, foi utilizado um volume de 27,5 µL de N,O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetil-cloro-silano, seguido de um período de incubação à 60 °C durante 60 min. A injeção foi 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 massas 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.⁽²²⁾

RESULTADOS

Desde sua implementação até julho de 2019, o Laboratório de Análise de Metabólitos do SGM - HCPA realizou 588 diagnósticos entre aminoacidopatias e desordens de ácidos orgânicos, dos quais apenas 4,1% (24 pacientes) representavam alguma Desordem do Ciclo da Ureia. O presente estudo avaliou o perfil laboratorial dos 24 pacientes em questão, através da análise de seus respectivos prontuários.

Por se tratar de um centro de referência para doenças genéticas, os pacientes atendidos no centro em questão provêm de regiões variadas do Brasil. No caso do grupo correspondente aos pacientes DCU, 37,5% dos casos eram provenientes da região Sul, seguido de 37,5% provenientes da região Sudeste, 17% da região Nordeste e o restante eram oriundos das regiões Norte (4%) e Centro-Oeste (4%).

Dentre os 24 pacientes estudados, 18 (75%) eram representantes do sexo masculino e 6 (25%) do sexo feminino. A idade na qual os pacientes apresentaram os primeiros sinais e sintomas e receberam atendimento clínico e laboratorial variou de 0 dias de vida até 15 anos de idade. Neste grupo, a deficiência de OTC e a deficiência de ASS (citrulinemia tipo I) demonstraram os diagnósticos mais frequentes, representando a mesma ocorrência de 8 pacientes (33,3%) para cada. A deficiência de ARG1 (argininemia) apresentou a terceira maior frequência, com um total de 5 pacientes (20,8%), seguido da deficiência de CPS1 com 2 pacientes (8,3%) e apenas 1 paciente foi diagnosticado como portador de acidúria argininosuccínica (4,2%). Não houve pacientes portadores de deficiência de NAGS ou de transportadores de citrulina e ornitina. Pouco mais da metade dos pacientes (54,16%), apresentaram sinais e sintomas característicos de DCU antes do primeiro mês de vida. Até onde se tem registro, a taxa de óbito do grupo em questão apresentou um percentual de 25% do número total de pacientes (3 pacientes diagnosticados com citrulinemia tipo 1, 1 com deficiência de OTC e 2 com deficiência de CPS1). A ocorrência de consanguinidade entre pais foi relatada em apenas 3 casos (12,5%), e outros 6 pacientes (25%) relataram ocorrência de óbito de algum familiar próximo após o aparecimento de sintomas semelhantes, sendo que 2 dos pacientes do grupo estudado eram irmãos. Apenas um dos pacientes DCU realizou pesquisa de mutação gênica, a qual demonstrou deleção em 3 pares de bases do éxon 9 na posição c.929_931delAAG p.Glu310del, descrito na literatura como característico de pacientes com deficiência de OTC tardia, sendo, então, confirmado o seu diagnóstico (tabela 1).

A análise demonstrou uma grande variabilidade de sinais e sintomas entre os pacientes, sendo estes achados demonstrados na tabela 2. Ao menos 50% do grupo apresentou vômitos e convulsões e 29% do total evoluiu para coma, salientando-se que 86% desses foram diagnosticados com deficiência de OTC.

Apenas 9/24 prontuários (37,5%) informavam a realização de dosagem de amônia sanguínea no paciente, das quais 89% apresentavam-se elevadas, sendo este um dado de grande valia pois, a hiperamonemia é o alvo de investigação primário quando se há suspeita de DCU em neonatos. Além disso, foram dosados níveis de ácido orótico na urina de 13 pacientes (54,2%), dos quais 10 (77%), demonstraram-se elevadas (tabela 3).

A análise de aminoácidos realizada por LC/MS/MS e HPLC, demonstrou citrulina aumentada em todos os pacientes com diagnóstico de citrulinemia tipo 1, assim como aumento de glicina, alanina e glutamina na grande maioria deste grupo. Os pacientes que apresentavam deficiência de OTC possuíam níveis de citrulina diminuídos em sua totalidade, assim como os aminoácidos alanina e glutamina demonstraram-se aumentados de maneira geral. Os pacientes diagnosticados com argininemia apresentaram níveis de arginina elevados em todos os casos. Ambos pacientes com deficiência de CPS1 demonstraram níveis de citrulina diminuídos e glutamina aumentada nas análises por tandem e HPLC, respectivamente. Os achados laboratoriais do único paciente com deficiência de ASL foram citrulina e glutamina aumentados, com diminuição de vários outros aminoácidos, como leucina, isoleucina, ornitina, metionina e fenilalanina. A dosagem de ácidos orgânicos não foi realizada em 100% dos pacientes, devido ao diagnóstico ser dado primariamente pelos resultados de dosagens de aminoácidos por HPLC ou LC/MS/MS. E de maneira geral, quando houve a dosagem de ácidos orgânicos, esta se demonstrou bastante variável, sendo os compostos 5-oxo-prolina e ácido láctico os achados mais frequentes (tabela 4).

Há registros de que 5 pacientes (20,8%) iniciaram tratamento com antibiótico, provavelmente porque os sinais e sintomas eram semelhantes aos de sepse neonatal. O estudo demonstrou também que 6 pacientes (25%) iniciaram tratamento com alguma classe de anticonvulsivante para o tratamento de sintomas. Após o diagnóstico, há a informação de que 5 pacientes (20,8%) iniciaram tratamento com drogas *scavenger*, 4 deles (80%) utilizando benzoato de sódio e apenas 1 (20%) utilizando fenilbutirato de sódio como forma de tratamento. Como complementação ao tratamento preconizado, 6 pacientes do grupo (25%) iniciaram dieta hipoproteica.

DISCUSSÃO

Este estudo compreendeu 24 casos de DCU diagnosticados em um centro de referência no sul do Brasil, com pacientes provenientes de todas as regiões do país. Estudos abordando o perfil brasileiro de pacientes com Desordens do Ciclo da Ureia ainda encontram-se escassos, tornando-se difícil a obtenção de informações mais acuradas sobre essas doenças.

As DCU representam apenas uma pequena parcela de diagnósticos quando comparadas ao grande grupo de aminoacidopatias e desordens de ácidos orgânicos existentes. No Brasil, nenhuma das doenças deste grupo está inclusa no programa de Triagem Neonatal, gerando assim uma escassez de estudos na área e a falta de um algoritmo que inclua valores de corte apropriados para a validação de um método

diagnóstico. Outro fator determinante na dificuldade diagnóstica das DCU é a grande variabilidade de seus sinais e sintomas, os quais se mostram muito semelhantes a outras patologias principalmente no período neonatal. A sepse neonatal, patologia que tem como características sintomáticas a instabilidade de temperatura, o estresse respiratório e a hiperventilação, por exemplo, é muito semelhante aos primeiros sinais de uma hiperamonemia.⁽⁸⁾ Neste cenário,

, há de se reconhecer a provável existência de uma grande parcela de pacientes DCU não diagnosticada ou subdiagnosticada, fator este agravado devido ao rápido e severo desenvolvimento das crises e a conseqüente alta taxa de mortalidade.

Dados referentes à frequência mundial de DCU informam uma maior ocorrência da deficiência de OTC, enquanto a citrulinemia tipo 1 (ASS), seria uma das menos frequentes.⁽⁵⁾ Em contraste a estes dados, foi verificado em nosso estudo uma prevalência equivalente nestes dois grupos. Ao mesmo tempo não foram registrados casos de deficiência da enzima N-acetilglutamato-sintase (NAGS) e ainda desordens relacionadas aos transportadores de membrana envolvidos na biossíntese da ureia, como a deficiência de ORNT1 e a citrulinemia tipo 2. Deficiências completas nos genes de enzimas proximais como a CPS1 e OTC são consideradas causadores de hiperamonemias mais graves.⁽²³⁾

A deficiência de OTC, diferente das demais DCU, possui seu gene localizado no cromossomo X e, portanto, quando presente em indivíduos do sexo masculino, geralmente manifesta um quadro neonatal muito grave, sendo esse grupo o de maior taxa de mortalidade (60%). A OTC caracteriza-se pelo aumento dos aminoácidos glutamina e alanina, e diminuição de citrulina plasmática.⁽⁵⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ Na tabela 4, podemos observar que o perfil de nossos pacientes demonstra-se bem semelhante ao descrito na literatura, com exceção da taxa de mortalidade que se demonstrou abaixo do esperado, com registro de óbito em apenas 1 paciente. Este dado pode ser decorrente da perda de contato com os pacientes à longo prazo ou devido ao pequeno número de pacientes diagnosticados.

Pacientes com citrulinemia tipo 1 (ASS), apresentam deficiência na enzima citosólica arginosuccinato sintetase 1 devido a variantes patogênicas no gene ASS1 localizado no cromossomo 9q34.11. Com a ocorrência de crises de hiperamonemia logo nos primeiros 28 dias de vida do paciente, seus sinais e sintomas demonstram-se altamente graves. Por outro lado, quando aparecem tardiamente, as características fenotípicas podem ser muito mais variáveis. No presente estudo, esses indivíduos obtiveram número de casos equivalente aos pacientes com deficiência de OTC, portanto há de se cogitar uma prevalência possivelmente maior desta DCU na população brasileira quando em comparação com a frequência mundial. Seu quadro clínico laboratorial apresentou hiperamonemia e elevados níveis de glutamina e citrulina plasmática (tabela 4), como já foi descrito na literatura.⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾ Crises convulsivas e acidose metabólica foram sintomas bastante comuns, ambos indicativos de uma severa crise metabólica.

Em 2012, Carvalho et. al, descreveram o perfil clínico e neurológico de 16 pacientes diagnosticados com argininemia provenientes de quatro regiões do Brasil,

demonstrando a paraparesia espástica como o desfecho mais relevante na clínica destes pacientes. Resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo, no qual este desfecho clínico apresentou-se recorrente na maioria dos pacientes do grupo correspondente à doença. A idade média do diagnóstico também apresentou certa semelhança, sendo ligeiramente mais tardia quando comparada com a grande maioria de casos abordados na literatura (1-4 anos de idade) (tabela 1). A hiperamonemia nestes casos se mostra menos frequente do que em outras DCU (tabela 3). Entretanto, os pacientes podem apresentar crise hiperamonêmica neonatal e/ou recorrente.⁽²³⁾⁽²⁹⁾

Pacientes que apresentaram deficiência da enzima CPS1 demonstraram perfil clínico característico ao reportado previamente na literatura, o qual consiste em uma hiperamonemia primária seguida de elevados níveis de glutamina concomitantes a diminuídos níveis de citrulina e arginina plasmática.⁽³⁰⁾ Apenas 2 casos de deficiência de CPS1 foram relatados neste estudo, apresentando severidade altíssima e óbito em ambos os casos, uma taxa maior do que a esperada quando em comparação com estudos clínicos de pacientes CPS1 provenientes de região européias e americanos.⁽²⁵⁾

As médias elevadas de amônia sanguínea descritas na tabela 3, correlacionam-se com os severos sinais e sintomas apresentados por nossos pacientes. É comprovado que sobreviventes a crises de hiperamonemia desenvolvem desabilidades que se correlacionam com número, severidade e duração ao episódio hiperamonêmico. Níveis superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$ proporcionam complicações muito sérias e diminuem as chances de sobrevivência dos pacientes. No entanto, este quadro ainda pode ser revertido se diagnosticado precocemente e com a ajuda de tratamento agressivo.⁽³¹⁾ O mecanismo de toxicidade causado pelo aumento da amônia no cérebro tem sido extensivamente estudado e existem fortes indícios de que este seja decorrente do acúmulo de glutamina nos astrócitos devido primeiramente à ação osmótica, seguido de uma disfunção e aumento da permeabilidade mitocondrial e finalmente pelo dano oxidativo.⁽³²⁾⁽³³⁾

Dosagens elevadas de ácido orótico na urina podem ocorrer em diversas doenças genéticas metabólicas, entretanto é inegável a importância deste parâmetro no diagnóstico das DCU, sendo um excelente marcador na deficiência de OTC, aonde este aumento é decorrente do acúmulo de carbamoil fosfato intramitocondrial, o qual pode se difundir para o citosol e estimular a via de síntese de novo das pirimidinas, resultando em um aumento das concentrações de ácido orótico. Os níveis de ácido orótico também devem ser utilizados para diferenciar a OTC de outras DCU sintomaticamente muito semelhantes, tais como a deficiência de CPS1 e de NAGS, as quais apresentam excreção normal de ácido orótico (tabela 3). Sendo assim esta dosagem, juntamente com a verificação de um quadro de hiperamonemia, se tornam os primeiros indicadores da existência de uma DCU.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

A taxa de pacientes que relatou casos de uma possível DCU e subsequente óbito na família foi considerável, sendo que dois dos pacientes do grupo eram irmãos, culminando no óbito do mais velho. No caso de um primeiro diagnóstico de doença hereditária na família, reforça-se a importância do aconselhamento genético. Assim, os pais têm a escolha de seguir em frente com alguma próxima gravidez ou optar por não correr riscos, seguindo em busca de outros meios de paternidade como a adoção, por exemplo.

No presente estudo, as análises de aminoácidos por HPLC e LC/MS/MS foram essenciais para se delinear e diferenciar o perfil de cada uma das DCU. Estas análises apesar de possuírem custos elevados quando comparadas à outros métodos de detecção, são imprescindíveis para que se obtenha o melhor delineamento possível de parâmetros bioquímicos, permitindo o diagnóstico correto, seja qual for a doença metabólica.

A análise de ácidos orgânicos na urina não foi realizada em todos os pacientes. Provavelmente os pacientes que passaram por este teste ainda estavam em fase de investigação para outras doenças metabólicas. Os compostos com níveis elevados mais recorrentes foram a 5-oxo-prolina e o ácido lático, decorrentes do aumento de ácido orótico e seus precursores e da acidose metabólica, respectivamente. O aumento de ácido hipúrico em alguns pacientes provavelmente ocorreu devido ao tratamento com drogas *scavenger* e a consequente excreção de seus metabólitos pela urina.⁽¹⁷⁾⁽³⁶⁾

Apenas um de nossos pacientes realizou pesquisa de gene para diagnóstico confirmatório, a qual foi realizada em outro país. A importância da análise molecular para diagnóstico confirmatório nas DCU torna-se discutível, pois identificar e reverter as crises hiperamonêmicas é o fator mais importante a curto prazo. Entretanto, a longo prazo, a análise molecular mostra-se de grande valia no aconselhamento genético ou mesmo em casos de diagnóstico pré-natal.

Finalmente, ressalta-se a importância de um cuidado especial e urgente por parte dos profissionais envolvidos no diagnóstico de Desordens do Ciclo da Ureia e a necessidade de uma Triagem Neonatal adequada para se estabelecer um perfil laboratorial e clínico acurado do paciente. O diagnóstico tardio de hiperamonemia pode gerar consequências severas e muitas vezes letais ao paciente e somente a identificação precoce e o tratamento adequado proverá o melhor prognóstico possível.

REFERÊNCIAS

1. Herman H, Shambaugh E. Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships acid cycle. 2018;20:83–7.
2. Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet D, Valle D, Sly WS eds. *The Metabolic and Molecular and Bases of Inherited Disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2001; 1909–1961.
3. Weiner ID, Verlander JW. Renal ammonia metabolism and transport. *Compr Physiol*. 2013;3(1):201–20.
4. Summar ML, Mew NA. Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. *Pediatr Clin North Am*. 2018;65(2):231–46.
5. Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Le Mons C, Haberle J, Lee HS, et al. The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab*. 2013;110(1–2):179–80.
6. Kožich V, Morris AAM, Blom HJ. Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment. 2016;310–8.
7. Rocha J, Sequeira S, Cabral A, Ferreira Almeida M. Consenso para o Tratamento Nutricional das Doenças do Ciclo da Ureia. *Acta Pediátrica Port*. 2009;40:175–84.
8. Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Karall D, Lindner M, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J Inherit Metab Dis*. 2019:1–39.
9. Waisbren SE, Stefanatos AK, Kok TMY, Hismi B. Neuropsychological attributes of urea cycle disorders: a systematic review of the literature. *J Inherit Metab Dis*. 2019:121-46.
10. Bachmann C. Mechanisms of hyperammonemia. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:653–62.
11. Teufel U, Weitz J, Flechtenmacher C, Prietsch V, Schmidt J, Hoffmann GF, et al. High urgency liver transplantation in ornithine transcarbamylase deficiency presenting with acute liver failure. *Pediatr Transplant*. 2011;15:110-5.
12. Nagamani SCS, Erez A, Lee B. Argininosuccinate lyase deficiency. *Genet Med*. 2012;14:501–7.
13. Stepien KM, Geberhiwot T, Hendriksz CJ, Treacy EP. Challenges in diagnosing and managing adult patients with urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2019;1136-1146.
14. Vernon HJ. Inborn errors of metabolism: Advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr*. 2015;169:778–82.
15. Merritt JL, Brody LL, Pino G, Rinaldo P. Newborn screening for proximal urea cycle disorders: Current evidence supporting recommendations for newborn screening. *Mol Genet Metab*. 2018;124(2):109–13.
16. Bartholomew D, Reichel R, Brusilow S. Prospective Diagnosis and Treatment of Urea Cycle Disorders. *Pediatr Res*. 1987;21(4):288-289.
17. De Las Heras J, Aldámiz-Echevarría L, Martínez-Chantar ML, Delgado TC. An update on the use of benzoate, phenylacetate and phenylbutyrate ammonia

- scavengers for interrogating and modifying liver nitrogen metabolism and its implications in urea cycle disorders and liver disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(4):439–48.
18. Enns GM, Berry SA, Berry GT, Rhead WJ, Brusilow SW, Hamosh A. Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med.* 2007;356(22):2282–92.
 19. Glasgow AM. A new method for measuring urinary orotic acid. *Am J Clin Pathol.* 1982;77(4):452–5.
 20. Rashed M, Bucknall M, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, Almattar M and Ozand PT. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem.* 1997; 43(7):1129-1141.
 21. Joseph MH and Marsden CA. Amino acids and sample peptides. In: Lim CK (ed) *HPLC of Small Peptides.* IRL Press, Oxford. 1986;13-27.
 22. Sweetmann L. Organic acid analysis. In: Hommes FA (ed) *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A laboratory manual.* Wiley-Liss, New York. 2006; 143-176.
 23. Ah Mew N, Krivitzy L, McCarter R, Batshaw M, Tuchman M. Clinical outcomes of neonatal onset proximal versus distal urea cycle disorders do not differ. *J Pediatr.* 2013;162(2):324-9.
 24. Lee JH, Kim GH, Yoo HW, Cheon CK. OTC gene in ornithine transcarbamylase deficiency: Clinical course and mutational spectrum in seven korean patients. *Pediatr Neurol.* 2014;51(3):354-359.
 25. Burgard P, Kölker S, Haegi G, Lindner M, Hoffmann GF. Neonatal mortality and outcome at the end of the first year of life in early onset urea cycle disorders—review and meta-analysis of observational studies published over more than 35 years. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(2):219–29.
 26. Shibata N, Hasegawa Y, Yamada K, Kobayashi H, Purevsuren J, Yang Y, et al. Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: Selective screening vs. expanded newborn screening. *Mol Genet Metab Reports.* 2018;16:5–10.
 27. Yoshitoshi-Uebayashi EY, Toyoda T, Yasuda K, Kotaka M, Nomoto K, Okita K, et al. Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(3):613–9.
 28. Zielonka M, Kölker S, Gleich F, Stützenberger N, Nagamani SCS, Gropman AL, et al. Early prediction of phenotypic severity in Citrullinemia Type 1. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(9):1858–71.
 29. Carvalho DR, Brum JM, Speck-Martins CE, Ventura FD, Navarro MMM, Coelho KEFA, et al. Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia. *Pediatr Neurol.* 2012;46(6):369–74.
 30. Diez-Fernandez C, Häberle J. Targeting CPS1 in the treatment of Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency, a urea cycle disorder. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(4):391–9.

31. Unsinn C, Das A, Valayannopoulos V, Thimm E, Beblo S, Burlina A, et al. Clinical course of 63 patients with neonatal onset urea cycle disorders in the years 2001-2013. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):1–11.
32. Walker V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes, Obes Metab.* 2009;11(9):823–35.
33. Parmeggiani B, Vargas CR. Oxidative stress in urea cycle disorders: Findings from clinical and basic research. *Clin Chim Acta.* 2018;477:121–6.
34. Salerno C, Crifò C. Diagnostic value of urinary orotic acid levels: Applicable separation methods. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;781(1–2):57–71.
35. Held PK, Haynes CA, De Jesús VR, Baker MW. Development of an assay to simultaneously measure orotic acid, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chim Acta.* 2014;436:149–54.
36. Kuhara T, Inoue Y, Ohse M, Krasnikov BF, Cooper AJL. Urinary 2-hydroxy-5-oxoproline, the lactam form of α -ketoglutaramate, is markedly increased in urea cycle disorders. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400(7):1843–51.

ANEXOS

Anexo 1: Tabelas e Figuras

Tabela 1. Perfil e características dos pacientes portadores de DCU.

Variável	ASS (n = 8)	OTC (n = 8)	ARG1 (n = 5)	CPS1 (n = 2)	ASL (n = 1)
% diagnósticos DCU	33,3%	33,3%	20,8%	8,3%	4,2%
Idade (meses) - média ± SD	31,4 ± 60,3	9,8 ± 8,5	88,8 ± 17,9	0,65 ± 0,15	0,3
Gênero					
Masculino	75,0%	87,5%	40,0%	100,0%	100,0%
Feminino	25,0%	12,5%	60,0%	-	-
Pais consanguíneos	20%	NI	17%	NI	NI
Óbito	20%	11%	NI	100%	NI

NI: não informado

Tabela 2. Sinais e sintomas dos pacientes portadores de DCU.

DCU	Paciente	Sexo	Idade do diagnóstico (meses)	Apresentação clínica	Consanguinidade	Casos na Família	Óbito
<i>Citrulinemia</i>	RN VS	F	<1	Hipotonia Hipoatividade Crises convulsivas Acidose metabólica	Não	Não	NI
<i>Citrulinemia</i>	RN ALR	M	<1	Cetonúria Lactato aumentado Acidose metabólica	Não	Não	Sim
<i>Citrulinemia</i>	IRL	F	187	Diagnóstico tardio	Não	Não	NI
<i>Citrulinemia</i>	RN KTGS	M	<1	Desconforto respiratório Lactato aumentado Hipercalemia Crises convulsivas Acidose metabólica	Sim	Não	Sim
<i>Citrulinemia</i>	HAC	F	1,3	Alteração de consciência Vômitos Crises convulsivas	Não	Não	NI
<i>Citrulinemia</i>	MSS	M	<1	Hiperproteinorraquia Plaquetopenia Hipoglicemia Alter. enzimas hepáticas Edema cerebral Vômitos Acidose metabólica	Sim	Não	Sim
<i>Citrulinemia</i>	ASA	M	39	Diagnóstico tardio	Não	Não	NI
<i>Citrulinemia</i>	EVZ	M	23	Hipotonia Retardo psicomotor Hipóxia cerebral Crises convulsivas	Não	Não	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	LGGA	M	17	Hipoatividade Sonolência	Não	Sim	Sim

				Ataxia Vômitos Coma			
<i>Deficiência de OTC</i>	JGGA	M	8	Alteração de consciência Vômitos Coma	Não	Sim	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	EHA	M	16	Hipoatividade Hipoglicemia Acidose metabólica Vômitos Crises convulsivas Coma	Não	Sim	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	RN PNS	M	<1	Hipoatividade Sucção débil Acidose metabólica Crises convulsivas Coma	Não	Sim	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	PSS	M	13	Hepatomegalia Retardo do crescimento Retardo neuropsicomotor Regressão neurológica Déficit cognitivo Vômitos Crises convulsivas	Não	Sim	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	RN RGS	M	<1	Recusa alimentar Sonolência Hipoglicemia Acidose respiratória Vômitos Coma	Não	Não	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	RN GAB	M	<1	Macrossomia fetal Taquidispnéia Ins, respiratória	Não	Não	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	NAA	F	24	Alteração comportamental Dificuldade de alimentação Alteração psicomotora Função hepática alterada Vômitos Coma	Não	Não	NI
<i>ARG1</i>	EER	F	96	Microencefalia Crises convulsivas	Não	Não	NI
<i>ARG1</i>	MCSQ	F	72	Paraparesia espástica Convulsões	Não	Não	NI
<i>ARG1</i>	FOM	F	84	Cianose Redução da atividade cerebral Regressão de fala e marcha	Sim	Não	NI
<i>ARG1</i>	FRS	M	120	Alteração comportamental Agitação Inquietude Paraparesia espástica Crises convulsivas	Não	Não	NI
<i>ARG1</i>	GAB	M	72	Hiperatividade Dificuldade de aprendizado Paraparesia espástica	Não	Não	NI
<i>CPSI</i>	DDR	M	<1	Alteração do encéfalo Crises convulsivas	Não	Sim	Sim
<i>CPSI</i>	ACRS	M	<1	Hipoatividade	Não	Não	Sim

					Hepatomegalia Apnéia Acidose metabólica Crises convulsivas Coma			
ASL	ESS	M	<1		Dificuldade de alimentação Vômitos Crises convulsivas Coma	Não	Não	NI

NI: não informado

Tabela 3. Marcadores bioquímicos dos pacientes portadores de DCU.

Achados laboratoriais	ASS (n = 8)	OTC (n = 8)	ARG1 (n = 5)	CPS1 (n = 2)	ASL (n = 1)	Valores de referência
Amônia sanguínea ($\mu\text{mol/L}$)	1464 (n = 1)	724 \pm 457 (n = 4)	<5 (n = 1)	549 \pm 62 (n = 2)	1400 (n = 1)	Até 80
Ácido orótico ($\mu\text{m/mg}$ de creat.)	206 \pm 12,2 (n = 3)	158,2 \pm 141 (n = 5)	107 \pm 102 (n = 2)	5,1 \pm 0,5 (n = 2)	60 (n = 1)	Até 14

Resultados expressos em média \pm SD

Tabela 4. Perfil de aminoácidos no sangue e ácidos orgânicos na urina de pacientes DCU.

DCU	Paciente	Aminoácidos no sangue	Ácidos orgânicos na urina
<i>Citrulinemia</i>	RN VSF	Citrulina \uparrow Glutamina \uparrow Alanina \uparrow Tirosina \downarrow	Ác. láctico \uparrow Ác. adípico \uparrow Ác. subérico \uparrow Ác. sebácico \uparrow
<i>Citrulinemia</i>	RN ALR	Citrulina \uparrow	NR
<i>Citrulinemia</i>	IRL	Citrulina \uparrow	NR
<i>Citrulinemia</i>	RN KTGS	Citrulina \uparrow Metionina \uparrow Alanina \uparrow	Ác. láctico \uparrow Ác. dicarboxílicos \uparrow
<i>Citrulinemia</i>	HAC	Citrulina \uparrow	Normal
<i>Citrulinemia</i>	MSS	Citrulina \uparrow Glicina \uparrow Alanina \uparrow Metionina \uparrow Glicina, treonina e arginina \uparrow	Ác. láctico \uparrow
<i>Citrulinemia</i>	ASA	Citrulina \uparrow Alanina \uparrow Glutamina \uparrow Glicina, treonina e arginina \uparrow	NR
<i>Citrulinemia</i>	EVZ	Citrulina \uparrow Glicina, treonina e arginina \uparrow	Normal

<i>Deficiência de OTC</i>	LGGA	Citrulina ↓ Alanina ↑	Ác. succínico ↑ Ác. láctico ↑ 3-hidroxi-butírico↑ 2-hidroxi-butírico↑ Ác. adípico ↑ Ác. fumárico ↑
<i>Deficiência de OTC</i>	JGGA	Citrulina ↓ Glutamina ↑ Alanina ↑	Normal
<i>Deficiência de OTC</i>	EHA	Citrulina ↓ Ornitina ↑ Alanina ↑ Glutamina ↑	Ác. láctico↑
<i>Deficiência de OTC</i>	RN PNS	Citrulina ↓	Normal
<i>Deficiência de OTC</i>	PSS	Citrulina ↓ Alanina ↑ Lisina ↑	5-oxo-prolina ↑
<i>Deficiência de OTC</i>	RN RGS	Citrulina ↓ Alanina ↑ Glutamina ↑ Glicina, treonina e arginina ↑ Glicina↑	Ác. láctico ↑ 5-oxo-prolina ↑
<i>Deficiência de OTC</i>	RN GAB	Citrulina ↓ Alanina ↑ Glutamina ↑	Ác. láctico ↑
<i>Deficiência de OTC</i>	NAA	Citrulina ↓ Glicina ↑ Glutamina ↑	Ác. hipúrico ↑
<i>ARG1</i>	EER	Arginina ↑ Glicina, treonina e arginina ↑	Normal
<i>ARG1</i>	MCSQ	Arginina ↑ Glicina, treonina e arginina ↑	NR
<i>ARG1</i>	FOM	Arginina↑	NR
<i>ARG1</i>	FRS	Arginina ↑	NR
<i>ARG1</i>	GAB	Arginina ↑	Normal
<i>CPS1</i>	DDR	Citrulina ↓ Tirosina ↓ Glutamina ↑	5-oxo-prolina ↑
<i>CPS1</i>	ACRS	Citrulina ↓ Glutamina ↑ Alanina ↑ Lisina ↑	5-oxo-prolina ↑ Ác. Láctico ↑ 3-hidroxi-butírico↑
<i>ASL</i>	ESS	Citrulina ↑ Glutamina ↑ Ornitina ↓ Leucina ↓ Isoleucina ↓ Metionina ↓ Fenilalanina ↓ Tirosina ↓	NR

NR: não realizado

Tabela 5. Medicamentos administrados aos pacientes DCU.

DCU	Paciente	Medicamento	Dieta
<i>Citrulinemia</i>	RN VS	Fenobarbital, domperidona	NI
<i>Citrulinemia</i>	HAC	Fenobarbital, benzoato de sódio	NI
<i>Citrulinemia</i>	MSS	AZT, fenobarbital, oxacilina e amicacina, dobutamina, benzoato de sódio, L-carnitina , L-arginina	hipoproteica
<i>Citrulinemia</i>	ASA	L-carnitina	hipoproteica
<i>Citrulinemia</i>	EVZ	Ácido valpróico, analgésicos, ácido fólico, benzoato de sódio e L-arginina	hipoproteica
<i>Deficiência de OTC</i>	EHA	Antibiótico, soro glicosado	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	PSS	Fenobarbital, lactulona, metronidazol	hipoproteica
<i>Deficiência de OTC</i>	RN RGS	Ampicilina, gentamicina	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	RN GAB	Ampicilina, gentamicina, dopamina e dobutamina	NI
<i>Deficiência de OTC</i>	NAA	Carbamazepina, L-arginina e ornitina	hipercalórica e hipoproteica
<i>ARG1</i>	MCSQ	Fenilbutirato de sódio	hipoproteica
<i>ASL</i>	ESS	Benzoato de sódio	NI

NI: não informado

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 Ensaio 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 order 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 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 order 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. 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.