Giselle Yuri Hayashi

**Otimização dos valores de referência da
17OH-progesterona neonatal de acordo com o peso ao
nascimento no programa de triagem neonatal da
APAE DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Tania Sanchez Bachega

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hayashi, Giselle Yuri

Otimização dos valores de referência da 17OH-progesterona neonatal de acordo com o peso ao nascimento no programa de triagem neonatal da APAE DE SÃO PAULO / Giselle Yuri Hayashi. -- São Paulo, 2015.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Tania Aparecida Sartori Sanchez Bachega.

Descritores: 1.Esteroide 21-hidroxilase 2.Hiperplasia adrenal congênita

Este trabalho foi realizado no Laboratório da APAE DE SÃO PAULO e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, parcialmente subsidiado por Auxílio Regular FAPESP 2014/07878-4.

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus pais,
Eduardo e Marina pela confiança e pelo apoio
depositado durante minha trajetória de vida.
Amor incondicional e os méritos lhes
pertencem.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida, sem ela nada disso seria possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e acima de tudo pelo comprometimento diário em abraçar a causa da Triagem Neonatal. Você faz parte da história.

À toda equipe do Laboratório da APAE DE SÃO PAULO:

Às bioquímicas, Cláudia Faure, Carla Vallejos, Tharin Ishikawa, Marcos, Amanda, Luciana Garcia, Sônia Hadachi, Heloise Martins, Gisele Balieiro e Daniele, pelo incentivo, confiança e principalmente paciência.

Às técnicas, as auxiliares de laboratório e esterilização por toda assistência, sem elas, nada disso seria possível.

Ao setor da Busca Ativa, pela ajuda constante, em especial à Gabriella, Andressa e Giselle Medina.

Resultado de um trabalho em equipe.

Todos vocês fazem parte desta conquista.

Ao grupo do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42:

À Profa Dra Berenice Bilharinho Mendonça pelo apoio ao trabalho desenvolvido.

Ao Dr Vinícius Nahime Brito pelo constante apoio e por compartilhar seu conhecimento estatístico na realização deste trabalho.

À Dra Regina Matsunaga Martin, pela imensurável ajuda, apoio e amizade.

À Izabel (carinhosamente Bel), Márcia Éster e Michele, pelo apoio, incentivo, paciência e acima de tudo pela amizade.

À Nilda, por toda ajuda e disponibilidade prestada principalmente na reta final do trabalho.

À Andresa De Santi, pela assistência no trabalho de bancada da Biologia Molecular.

À Helena e Atecla pelos testes confirmatórios.

Ao Dr Daniel Fiordelasio de Carvalho, pela assistência, pelo apoio, amizade e trabalho em equipe.

À Dra Larissa e Dra Guiomar, pela assistência e dedicação aos nossos bebês.

Aos doutores Heraldo Passolo de Souza, Alexander Lima Jorge e Carlos Longui, pelas valiosas observações realizadas durante a Banca de Qualificação.

A todos os colaboradores do Laboratório APAE DE SÃO PAULO e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular que de forma direta ou indireta puderam contribuir para que esse trabalho pudesse ser concluído.

Aos familiares e amigos que vivenciaram essa jornada comigo do início ao fim e estiveram ao meu lado, aconselhando, incentivando e torcendo para que esse projeto fosse um sucesso: meus pais, Eduardo e Marina, meus irmãos, Evandro e Eduardo, Teresa, Helena, Wendy, Ana Paula, Ricardo, Fernanda, Érica, Cláudia, Renata, Flávio, Maricene, Elaine, Ana Christina, Guido, Robinson, Ricardo Araújo..... o meu muito obrigado.

A FAPESP pelo auxílio regular à pesquisa nº 2014/07878-4.

Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.

Clarice Lispector

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase.....	2
1.2.Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita.....	7
1.3.Triagem Neonatal no Brasil.....	10
1.4.Testes Confirmatórios Hormonais.....	13
1.5.Testes Confirmatórios Moleculares.....	15
1.6. Justificativa do Estudo.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos Gerais.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Casuística.....	20
3.2. Dosagens Laboratoriais.....	21
3.3. Estudo Molecular do Gene <i>CYP21A2</i>	23
3.4. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1.Valores da N17OHP de Recém-Nascidos Afetados por HAC-21OH....	28
4.2. 17OH-progesterona Neonatal de Recém-Nascidos com Resultados Falso-Positivos.....	31
4.3. Testes Confirmatórios: Hormonal Sérico e Molecular.....	34

5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	46
7. ANEXO	48
Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTAS DE ABREVIATURAS

17OHP	17OH-progesterona
21OH	21-hidroxilase
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo
<i>CYP21A2</i>	Gene codificador da enzima 21-hidroxilase
DOC	Deoxicorticosterona
DO	Diário oficial
DP	Desvio padrão
E	Especificidade
F	Feminino
P450c21	Enzima 21-hidroxilase
FP	Falso positivo
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
M	Masculino
MS	Ministério da Saúde
N17OHP	17OH-progesterona neonatal
NC	Não clássica
PS	Perdedora de sal
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RFP	Resultado falso positivo
RFN	Resultado falso negativo
Rn	Recém-nascido
S	Sensibilidade
SUS	Sistema Único de Saúde
SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal

TN	Triagem Neonatal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VS	Virilizante simples
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Esteroidogênese das glândulas adrenais. A enzima 21-hidroxilase (P450c21) catalisa a conversão da 17OH-progesterona em 11-deoxicortisol e da progesterona em deoxicorticosterona. A diminuição da atividade desta enzima causa prejuízo na síntese de cortisol, com consequente aumento compensatório na produção do hormônio ACTH, o qual ocasiona hiperplasia do córtex adrenal e estimula a produção excessiva dos precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a síntese de andrógenos adrenais.....	3
Figura 2- Meninas com as formas clássicas da HAC-21OH e com diferentes graus de virilização da genitália externa, quantificadas pela escala de Prader. Grau I: clitoromegalia isolada, Grau II: clitoromegalia, fusão posterior de grandes lábios, orifícios uretral e vaginal com aberturas independentes no períneo. Grau III: clitoromegalia, fusão posterior de grandes lábios e abertura do seio urogenital no períneo.....	4
Figura 3 – Manifestações clínicas no sexo masculino com a forma virilizante simples. A: pode haver macrogenitossomia ao nascimento, mas na maioria a genitália não chama a atenção para o diagnóstico no período neonatal, como neste menino com 3 meses de idade. B: na ausência de tratamento ocorrem sinais de pseudopuberdade precoce, tais como neste menino com 5 anos, observa-se pelos pubianos, aumento peniano e da massa muscular.....	5
Figura 4 – Coleta de amostra neonatal. A: punção lateral do calcâneo, B: impregnação da gota de sangue no papel filtro.....	20

Figura 5- Valores da N17OHP (ng/mL) dos Rns afetados com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH, de acordo com o tempo de vida na coleta..... 31

Figura 6- Valores da N17OHP (ng/mL) de testes com resultados falso-positivos tomando-se como valor de referência o percentil 99,5, de acordo com peso ao nascimento e tempo de vida na coleta..... 33

Figura 7- Valores da N17OHP (ng/mL) de testes com resultados falso-positivos tomando-se como valor de referência o percentil 99,8, de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta..... 33

Tabela 1 - Mediana e intervalo interquartil da N17OHP (ng/mL) de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.....	27
Tabela 2 - Valores de corte da N17OHP(ng/mL) utilizando os percentis 99,5 e 99,8 de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.....	28
Tabela 3 - Valores da N17OHP (ng/mL) de recém-nascidos com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH diagnosticados pela triagem neonatal.....	30
Tabela 4 - Porcentagem de resultados falso-positivos utilizando-se valores de referência da N17OHP para coletas realizadas nos grupos G1 (< 72h de vida) e G2 (após ≥ 72h), de acordo com o peso ao nascimento nos percentis 99,5 e 99,8.....	32
Tabela 5 - Sensibilidade (%), especificidade (%), valores preditivo positivo e negativo (%) foram definidos para os grupos G1 e G2 e para cada grupo de peso ao nascimento tendo em conta os percentis 99,5 e 99,8.....	34
Tabela 6 - Genótipo, forma clínica predita pelo genótipo e forma clínica apresentada em recém-nascidos com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH.....	36

RESUMO

Hayashi GY. *Otimização dos valores de referência da 17OH-progesterona neonatal de acordo com o peso ao nascimento no programa de triagem neonatal da APAE DE SÃO PAULO* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: A Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase (HAC) é uma doença com mortalidade neonatal elevada sendo elegível para programas públicos de Triagem Neonatal (TN). A HAC é causada por mutações no gene *CYP21A2*, as quais acarretam diferentes comprometimentos da atividade enzimática e resultam em espectro amplo de manifestações clínicas. Apesar da eficiência da TN para diagnosticar os casos graves, a taxa elevada de resultados falso-positivos (RFP), principalmente relacionados à prematuridade, é um dos maiores problemas. Porém, resultados falso-negativos também podem ocorrer em coletas antes de 24 horas de vida. No Brasil, a coleta da amostra neonatal difere entre os municípios, podendo ser no terceiro dia de vida como após. **Objetivo:** Avaliar se os valores da 17OH-progesterona neonatal (N17OHP) das coletas no terceiro dia de vida diferem significativamente das coletas a partir do quarto dia. Determinar qual percentil (99,5 ou 99,8) pode ser utilizado como valor de corte para a N17OHP, de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta, a fim de que proporcione taxa menor de RFP. **Métodos:** Foi avaliada, retrospectivamente, a N17OHP de 271.810 recém-nascidos (Rns) de acordo com o tempo de vida na coleta (G1: 48 - <72h e G2: ≥72h) e peso ao nascimento (P1: ≤1.500g, P2: 1.501-2.000g, P3: 2.001-2.500g e P4: ≥2.500g), pelo método imunofluorimétrico. Testes com resultados alterados foram confirmados no soro por Espectrometria de Massas em Tandem – LC-MS/MS. Rns afetados e/ou assintomáticos e com valores persistentemente elevados de 17OHP sérica foram submetidos ao estudo moléculas, sequenciamento do gene *CYP21A2*. **Resultados:** os valores da N17OHP no grupo G1 foram significativamente menores do que em G2 em todos os grupos de peso ($p < 0.001$). A taxa de RFP em G1 e G2 foi de 0,2% para o percentil 99,8 e de 0,5% para o percentil 99,5 em ambos os grupos. O percentil 99,8 da N17OHP foi o melhor valor de corte para distinguir os Rns não afetados dos afetados, cujos valores são: G1 (P1:

120; P2: 71; P3: 39 e P4: 20 ng /mL) e em G2 (P1: 173; P2: 90; P3: 66 e P4: 25 ng/mL). Vinte e seis Rns do grupo G1 apresentaram a forma perdedora de sal (PS) (13H e 13M), nestes a N17OHP variou de 31 a 524 ng/mL e vinte Rns no grupo G2 (8H e 12M), nestes a N17OHP variou de 53 a 736 ng/mL. Para ambos os grupos foram encontrados três Rns com a forma virilizante simples (1H e 2M) e os valores da N17OHP variaram de 36 a 51 ng/mL. Resultados falso-negativos não foram relatados. O valor preditivo positivo (VPP) no teste do papel filtro foi de 5,6% e 14,1% nos grupos G1 e G2, respectivamente, ao se utilizar o percentil 99,8, e de 2,3% e 7% nos grupos G1 e G2 ao se utilizar o percentil 99,5. Dentre os casos com TN alterada (RFP), 29 deles também apresentaram 17OHP sérica elevada quando dosada por LC-MS/MS. Os casos assintomáticos foram acompanhados até normalização da 17OHP sérica e/ou submetidos ao estudo molecular, que identificou dois Rns com genótipo que prediz a forma não clássica. **Conclusão:** a melhor estratégia para otimização do diagnóstico da HAC na triagem neonatal é se padronizar valores de corte da N17OHP em dois grupos de acordo com o tempo de vida na coleta (antes e depois de 72 horas), subdivididos em quatro grupos de peso. A utilização dos valores de corte do percentil 99,8 se mantém eficaz no diagnóstico da HAC-21OH na triagem neonatal, reduzindo de forma significativa a taxa de RFP, sem perda do diagnóstico da forma PS.

Descritores: esteróide 21-hidroxilase; hiperplasia adrenal congênita; triagem neonatal; 17-hidroxiprogesterona; recém-nascido; prematuro; peso ao nascer.

SUMMARY

Hayashi GY. *Optimization of the reference values of neonatal 17OH-progesterone according to birth weight in newborn screening program of APAE DE SÃO PAULO* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Introduction: Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase is disorder with high mortality rate, being eligible for Public Programs of Newborn Screening (NBS). It is caused by mutations in the *CYP21A2* gene leading to different impairments of enzyme activity and consequently to a spectrum of clinical manifestations. Despite the efficacy of NBS in diagnosing the severe clinical forms, the main concern is the high rate of false-positive results (FPR), mainly related to prematurity. False-negative results can also occur due to precocious sample collections, especially before 24 hs of life. Neonatal samples are collected at different times across our country, at third day of life or after.

Objective: To determine if the values of neonatal 17OH-progesterone (N17OHP) collected on the third day of life differ significantly to the ones collected after the fourth day. To evaluate the best percentile of N17OHP values, according to birth-weight and age at the sample collection, to be used as a cut-off in NBS, in order to result in lower rate of FPR. **Methods:** N17OHP of 271,810 newborns (NB) according to sample collection time (G1: 48 - <72 hs and G2: ≥72 hs) and birth-weight (P1: ≤1,500g, P2: 1,501-2,000g, P3: 2,001-2,500 and P4: >2,500g) were retrospectively evaluated. N17OHP was measured by immunofluorimetric assay. N17OHP tests with altered values were confirmed through serum 17OHP by Tandem Mass Spectrometry – LC-MS/MS. Affected newborns (NB) and those asymptomatic with persistently increased serum 17OHP levels were submitted to molecular analysis, entire *CYP21A2* gene sequencing. **Results:** N17OHP values of G1 on the third day of life were significantly lower than those of G2, in all birth-weight groups ($p < 0.001$). The FPR rate in G1 and G2 was 0.2% using the 99.8th and 0.5% in G1 and G2 using the 99.5th. The 99.8th percentile of N17OHP values was the best cut-off for distinguishing unaffected from affected NBs: G1 (P1: 120 ng/mL; P2: 71; P3: 39 and P4: 20 ng/mL) and G2 (P1: 173 ng/mL; P2: 90; P3: 66 and P4: 25 ng/mL). Twenty six (13M and 13F) NB were diagnosed with the salt wasting (SW) form,

their N17OHP values ranged from 31 to 524 ng/mL. Twenty (8M, 12F) NB were diagnosed with the SW form in G2 group, N17OHP values ranged from 53 to 736 ng/mL. Three NB were diagnosed with the simple virilizing form (1M and 2F) in G1 and G2, their N17OHP values ranged from 36 to 51 ng/mL. False-negative results were not reported. The positive predictive value (PPV) of an altered neonatal test using the 99.8 percentile was 5.6% and 14.1% in G1 and G2, respectively, and using the percentile 99.5 was 2.3% and 7% in G1 and G2, respectively. Among cases with abnormal N17OHP result (RFP), 29 of them still presented with increased serum 17OHP levels through LC-MS/MS. Asymptomatic cases were followed up until normalization of serum 17OHP and/or submitted to molecular analysis, which identified two Rns with genotype that predicts the nonclassical form. **Conclusions:** the best strategy to optimize the CAH-NBS is to adjust N17OHP levels into two groups according to age at sample collection (before and after 72 hs), subdivided into four birth-weight groups. The use of N17OHP values according to the 99.8th remains effective to perform the CAH diagnosis CAH and significantly reduces the RFP rate without loss of diagnosis of the severe clinical forms.

Descriptors: steroid 21-hydroxylase; adrenal hyperplasia, congenital; neonatal screening; 17-hydroxyprogesterone; infant, newborn; infant, premature; birth weight.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hiperplasia Adrenal Congênita por Deficiência da 21-Hidroxilase

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) é nome dado a um grupo de doenças endócrinas potencialmente letais, que decorrem do comprometimento da ação de uma das enzimas envolvidas na síntese do cortisol. Dentre os defeitos enzimáticos, a deficiência da 21-hidroxilase (21OH), *CYP21A2*, é o mais frequente, ocorrendo em 90 a 95% dos casos (1-5). Embora a doença seja comum em filhos de pais consanguíneos, a frequência de indivíduos portadores de mutações no gene *CYP21A2* (heterozigotos) na população em geral é de aproximadamente 1:50 (6), o que contribui para a frequência elevada da doença.

A enzima 21-hidroxilase participa da síntese de glicocorticoides e mineralocorticoides, catalisando a conversão da 17OH-progesterona (17OHP) em 11-deoxicortisol, um precursor do cortisol e a conversão de progesterona em deoxicorticosterona (DOC), um precursor da aldosterona. A diminuição da atividade desta enzima causa prejuízo na síntese de cortisol, com consequente aumento compensatório na produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual ocasiona hiperplasia do córtex adrenal e estimula a produção excessiva de precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a síntese de andrógenos adrenais, que não depende da ação da enzima 21-hidroxilase (4, 6). Portanto, a doença apresenta manifestações clínicas decorrentes da deficiência de glicocorticoide e/ou mineralocorticoide, hormônios essenciais à vida, sobretudo em situações de estresse e também do excesso de andrógenos nos períodos pré e pós-natal.

Figura 1. Esteroidogênese das glândulas adrenais. A enzima 21-hidroxilase (P450c21) catalisa a conversão da 17OH-progesterona em 11-deoxicortisol e da progesterona em deoxicorticosterona. A diminuição da atividade desta enzima causa prejuízo na síntese de cortisol, com consequente aumento compensatório na produção do hormônio ACTH, o qual ocasiona hiperplasia do córtex adrenal e estimula a produção excessiva dos precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a síntese de andrógenos adrenais.

A HAC-21OH é causada pela presença de mutações no gene que codifica a enzima, *CYP21A2*, as quais resultam em diferentes comprometimentos da atividade enzimática e ocasionam um espectro de formas clínicas (7, 8). Tradicionalmente estas formas clínicas são divididas em dois grandes grupos: forma clássica, com manifestações pré e pós-natais e a forma não clássica (NC), cujos sintomas se iniciam tardiamente, podendo ser na infância, puberdade ou vida adulta.

Na forma não clássica (NC) os sintomas ocorrem mais tardiamente, podendo incluir aparecimento precoce de pelos pubianos em ambos os sexos, irregularidade menstrual, hirsutismo e/ou infertilidade no sexo feminino. A forma NC possui manifestações clínicas de morbidade menor, não sendo do interesse de diagnóstico precoce em programas de triagem neonatal (9, 10).

A forma clássica por sua vez é subdividida em perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS) (6, 8, 11, 12). A forma VS caracteriza-se por virilização pré-natal da genitália externa feminina, a qual pode variar desde clitoromegalia isolada à fusão das pregas urogenitais com aparência semelhante à de uma genitália masculina normal, podendo inclusive levar a erros de atribuição de sexo ao nascimento (Figura 2) (13-15).

Figura 2. Meninas com as formas clássicas da HAC-21OH e com diferentes graus de virilização da genitália externa, quantificadas pela escala de Prader. Grau I: clitoromegalia isolada, Grau II: clitoromegalia, fusão posterior de grandes lábios, orifícios uretral e vaginal com aberturas independentes no períneo. Grau III: clitoromegalia, fusão posterior de grandes lábios e abertura do seio urogenital no períneo.

No sexo masculino com forma VS, é descrito macrogenitossomia ao nascimento; porém, esta não é perceptível na maioria dos casos, o que contribui para maior dificuldade diagnóstica deste sexo (Figura 3A) (16). Esta forma clínica também causa virilização pós-natal em ambos os sexos, caracterizada por aumento do clitóris ou pênis, aparecimento precoce dos pelos pubianos, aumento da massa muscular, acne e engrossamento da voz (Figura 3B) (17, 18). Ocorre também aumento da velocidade de crescimento; porém, com maior avanço da idade óssea, resultando em fechamento epifisário

precoce e, conseqüentemente, baixa estatura final (17). Embora a síntese de aldosterona também esteja comprometida nos pacientes afetados por esta forma clínica, existe uma produção pequena, porém suficiente para se evitar o desenvolvimento da desidratação hiponatrêmica (9).

Figura 3. Manifestações clínicas no sexo masculino com a forma virilizante simples. A: pode haver macrogenitosomia ao nascimento, mas na maioria a genitália não chama a atenção para o diagnóstico no período neonatal, como neste menino com 3 meses de idade. B: na ausência de tratamento ocorrem sinais de pseudopuberdade precoce, tais como neste menino com 5 anos, observa-se pelos pubianos, aumento peniano e da massa muscular.

Setenta a 75% dos casos com forma clássica (5, 19) apresentam a forma PS, que possui comprometimento maior na síntese de aldosterona. Além dos sinais de virilização observados na forma anterior, ocorre também perda de peso seguida de desidratação hiponatrêmica nas primeiras semanas de vida. Esta forma clínica poderá evoluir para choque hipovolêmico e óbito sem diagnóstico e tratamento precoces (3, 5).

As formas clássicas da HAC-21OH, PS e VS, são de interesse da triagem neonatal já que quando não diagnosticadas e tratadas precocemente apresentam complicações potencialmente graves, tais como a crise de perda de sal, os erros de determinação de sexo ao nascimento e pseudo-puberdade precoce em ambos os sexos, com comprometimento da altura final.

Dada a gravidade das formas clássicas da deficiência da 21-hidroxilase e da possível ausência de sintomas evidentes ao nascimento, estudo realizado em 1988 por *Pang et al.* (8) avaliou a eficácia da adição da dosagem da

17OHP em amostras coletadas em papel filtro para diagnóstico precoce da doença. A partir de dados de 6,5 milhões de recém-nascidos submetidos à triagem, foi observado que a forma clássica da HAC-21OH possui incidência mundial de aproximadamente 1:15.000 nascidos vivos, variando de 1:10.000 a 1:14.000 nos países da Europa (20, 21). Foi demonstrado que a HAC-21OH possui incidência muito elevada em duas populações isoladas: nos esquimós Yupik do sudoeste do Alaska (1:282) e nos habitantes da ilha francesa de La Reunion no Oceânico Índico (1:2.141) (8). Trabalhos recentes realizados na população brasileira demonstraram que a HAC também possui frequência elevada em nosso meio, ocorrendo em aproximadamente 1:10.300 nascidos vivos (13, 22).

De forma geral, nos países que não realizam a triagem neonatal para a HAC-21OH, ocorre frequência menor do diagnóstico da forma perdedora de sal e, sobretudo do sexo masculino (20, 23). Observamos esta distribuição na análise da casuística do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HC-FMUSP, um dos Centros de Referência para o tratamento desta doença em nosso Estado. Nesta série de pacientes diagnosticados sem triagem neonatal, a forma PS compreende apenas 55% dos casos com forma clássica e o sexo masculino correspondeu apenas 1/5 dos casos. Como o padrão da herança desta doença é autossômico recessivo, esperava-se diagnosticar igual proporção de afetados entre os sexos. Adicionalmente, no sexo feminino embora a virilização da genitália externa seja uma manifestação clínica evidente, a qual poderia chamar a atenção para o diagnóstico, observamos que a atipia genital não foi identificada ao nascimento em aproximadamente 37% das meninas (21, 24). Desta amostra de pacientes 46,XX, 16% foram registradas no sexo masculino e, na maioria delas, os pais concordaram na adoção do tratamento feminilizante após a avaliação psicológica que identificou identidade de gênero feminina. Entretanto, nos casos remanescentes (8,7% das pacientes com atipia genital), a avaliação psicológica evidenciou identidade de gênero masculina e apesar do cariótipo 46,XX e da presença de genitália interna feminina normal, foi necessária a adoção de tratamento masculinizante. A maioria destas pacientes 46,XX que

permaneceram no sexo social masculino apresentavam a forma VS e tiveram o diagnóstico muito tardio da doença.

Embora São Paulo seja um grande centro médico, os dados da nossa casuística indicam a falha diagnóstica da HAC-21OH no período neonatal por meios clínicos, especialmente nos meninos com forma PS, que estão indo a óbito no primeiro ano de vida (21, 24).

1.2. Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita

Estas características, como frequência elevada e morbi/mortalidade significativas, tornam a HAC-21OH uma doença de eleição para inclusão em programas públicos de triagem neonatal. A triagem neonatal para a HAC-21OH faz parte do programa de saúde em todo o Estados Unidos e em alguns países da Europa, como França e Suécia. Observa-se que a implantação da triagem causa redução significativa das mortes no período neonatal por crise de perda de sal, assim como normaliza a proporção de diagnóstico do sexo masculino em relação ao feminino (5, 12, 25).

A decisão sobre a inclusão de uma doença em um programa público de triagem neonatal, dentre outros requisitos, baseia-se também na sua frequência populacional. O Brasil é um país de grandes proporções e dependendo da região ocorrem diferentes miscigenações, as quais podem modificar a incidência da HAC-21OH. Existem poucos trabalhos que avaliaram a frequência da HAC-21OH em nossa população, dados do Programa Regional de Porto Alegre-RS identificaram uma incidência de 1:7.533 nascimentos. Torna-se importante salientar que este trabalho baseou-se na análise de dados da triagem de 82.870 recém-nascidos, procedentes de vários estados brasileiros, não sendo informado se poderiam pertencer a isolados geográficos, onde existe elevada frequência do gene. Considerando que este estudo não apresentou os dados dos testes confirmatórios de um teste de triagem positivo, não podemos afastar a hipótese de que esta incidência elevada seja decorrente da inclusão de resultados falso-positivos, um problema frequente da triagem da HAC-21OH.

No Brasil, até 2011, a triagem da HAC-21OH fazia parte do Programa Público de Triagem apenas nos estados de Goiás e Santa Catarina, que a realizavam com verba própria. Estima-se que mais do que 90% de nativos participem destes programas. Estudo recente que analisou os dados da triagem do Estado de Goiás observou que a HAC-21OH incide em 1:10.325 nascimentos e que a forma perdedora de sal compreendeu 80% dos casos com forma clássica. Adicionalmente, foi observada mesma proporção de diagnóstico entre os sexos masculino e feminino (22). Estes dados demonstram que a triagem da HAC-21OH no Estado de Goiás foi efetiva no diagnóstico do sexo masculino, bem como da forma PS; além de ter demonstrado a frequência alta da doença naquela região. A comparação das características clínicas das casuísticas de Goiás e de São Paulo, casuísticas diagnosticadas com e sem triagem neonatal, evidenciam a necessidade de se incluir a HAC-21OH no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) para todos os Estados brasileiros. Baseado nesses dados, a Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP enviou um projeto para a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo defendendo a inclusão do diagnóstico da HAC na triagem neonatal, o que contribuiria para a redução da mortalidade infantil. Mediante ao parecer técnico favorável, subsequentemente, o Ministério da Saúde (MS) reconheceu a importância desta inclusão no Programa Nacional de Triagem Neonatal pela Portaria nº 2.829 de 14/12/2012.

Importante ressaltar que outro critério para se implantar a triagem de uma determinada doença é ter em mente que a metodologia diagnóstica deva ser de fácil execução, custo não elevado e que deve haver disponibilidade de tratamento, diminuindo assim a morbi/mortalidade.

Considerando a Portaria nº 506 de 06/05/13 que torna o Estado de São Paulo apto para iniciar a implantação da Fase IV, através da publicação no Diário Oficial do Estado em 09/10/13, a triagem neonatal para a HAC iniciou em nosso Estado em novembro de 2013.

Apesar da eficácia diagnóstica da triagem neonatal da HAC, um dos grandes problemas é a frequência elevada de resultados falso-positivos (RFP) (5, 6, 26). Isso ocorre porque um teste de triagem habitualmente tem sensibilidade elevada para minimizar a ocorrência de resultados falso-

negativos. O objetivo de um teste de triagem é selecionar precocemente, dentro de uma grande população, indivíduos que apresentem risco maior para uma determinada condição. Esse grupo, selecionado pela triagem, deverá ser submetido a um teste confirmatório com especificidade maior, geralmente de custo maior, mas com maior precisão diagnóstica.

A triagem neonatal da HAC-21OH é realizada pela determinação das concentrações de 17OHP, o hormônio que antecede o bloqueio enzimático, em amostras obtidas de sangue periférico e depositadas no papel filtro. Três técnicas são as mais utilizadas para dosagem da 17OHP: radioimunoensaio (RIE), *enzima-linked immunosorbent assay (ELISA)* e *time-resolved fluoroimmunoassay (DELFA)* (27, 28). Essas técnicas medem a concentração da 17OHP neonatal (N17OHP) a partir de um disco de 1/8" ou 3,2 mm de papel filtro impregnado com sangue seco, obtido da punção do calcanhar do recém-nascido após 48 horas de vida (23).

Recém-nascidos portadores da forma PS, em geral, apresentam valores da N17OHP muito elevados (>100 ng/mL em soro equivalência) em coletas a partir do quarto dia de vida (19, 20, 24, 29). Entretanto, é importante a determinação dos valores de normalidade no teste de triagem neonatal (TN), isto torna possível se determinar a sensibilidade e especificidade inerentes ao método utilizado e avaliar sua eficácia quando aplicados a determinadas populações.

A N17OHP pode apresentar variações significativas de acordo com a idade gestacional, peso ao nascimento e condição clínica do recém-nascido (Rn). Indivíduos prematuros e/ou com baixo peso ao nascimento podem apresentar concentrações transitoriamente elevadas da N17OHP, o que contribuem para a frequência elevada de RFP, geralmente observados nesta triagem. Esta elevação da N17OHP poderia ser decorrente de *clearance* metabólico baixo por imaturidade hepática e/ou estresse neonatal provocado por peso baixo ao nascimento e/ou doença coexistente (26, 30, 31).

Dependendo da metodologia utilizada, RFP ocorrem em 0,4 a 9,3% dos testes (5, 6, 29, 32), prematuridade e peso baixo ao nascimento corroboram para aproximadamente 70% destes resultados (5, 6, 29, 31, 32), os quais decorrem de reações cruzadas com outros precursores esteroidais, tais como,

17OH-pregnenolona e sulfato de 17OH-pregnenolona (33). O problema dos resultados positivos de uma triagem é que estas crianças precisam ser mantidas em seguimento até que ocorra uma definição diagnóstica ou a normalização da 17OHP sérica. Estas situações não só aumentam o custo de um programa de triagem, como causam grande ansiedade para os pais.

A fim de se viabilizar a triagem neonatal da HAC-21OH, com a diminuição do índice de reconvocação e com a melhora do valor preditivo positivo do teste, a literatura sugere que os valores da N17OHP sejam ajustados de acordo com o grau de prematuridade (11, 34-37). Esta padronização, se realizada em quatro ou mais grupos de acordo com o grau de prematuridade, faz com que o índice de resultados falso-positivos diminua de 5,2 para 0,03% na maioria dos estudos populacionais (13, 34, 38).

A idade gestacional é considerada a variável mais adequada para padronização dos valores de normalidade da N17OHP (39, 40); porém, nos países em que não se realiza a ultrassonografia obstétrica para se confirmar a idade gestacional referida pela mãe, sugere-se que esta variável seja substituída pelo peso ao nascimento e que a padronização da N17OHP seja realizada em quatro ou mais faixas de peso. O importante é que cada serviço padronize os seus valores de referência de acordo com a população e metodologia utilizada (34).

1.3. Triagem Neonatal no Brasil

Considerando que no Brasil a ultrassonografia obstétrica não é realizada para se aferir a idade gestacional, Cardoso *et al* (39), realizaram a padronização dos valores de referência da N17OHP ajustados para o peso ao nascimento em dois grandes grupos ($< 2.500\text{g}$ e/ou < 36 semanas e $\geq 2.500\text{g}$ a termo), porém, porcentagem significativa de resultados falso-positivos ainda foi observada. Entretanto, tanto o papel de filtro quanto o *kit* utilizado deste estudo foram descontinuados pelos seus fabricantes. Vale a pena ressaltar que novos valores de referência devam ser padronizados todas as vezes que se muda o anticorpo dos *kits*, bem como o tipo do papel de filtro.

Atualmente, o Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) da APAE DE SÃO PAULO utiliza o método imunofluorimétrico - Auto DELFIA-B024-112 para a dosagem da N17OHP, que contem um anti-soro mais específico do que o mencionado acima, tornando-se necessária a determinação de seus respectivos valores de referência.

Até meados de 2012, a maioria dos centros que realizavam de maneira pioneira a triagem neonatal da HAC no Brasil (Goiás, Santa Catarina e laboratórios privados) utilizavam o método imunofluorimétrico (AutoDELFIA) com dois pontos de corte ajustados para o peso, o que ainda resultava em porcentagem significativa de RFP (22). A partir da introdução da triagem para HAC no PNTN, este índice elevado de falso-positivos ao se utilizar apenas dois pontos de corte poderia inviabilizar o programa, pois resultaria em índice considerável de convocações, aumentaria o custo da triagem, além de causar estresse psicológico para as famílias.

O Laboratório APAE DE SÃO PAULO foi o primeiro a realizar a triagem neonatal conhecida como “Teste do Pezinho” no Brasil, inicialmente para detecção da Fenilcetonúria e do Hipotireoidismo Congênito. Por intermédio do trabalho da APAE DE SÃO PAULO, foram fornecidos subsídios para elaboração da lei Estadual que tornou obrigatória a realização do teste para o Estado de São Paulo, até que a Lei Federal nº 8069 (13/07/1990) do Estatuto da Criança e do Adolescente tornou-a obrigatória em todo o território nacional (41).

O PNTN foi criado em 6 de junho de 2001 (Portaria GM/MS nº822) com o objetivo de fazer com que a triagem neonatal atinja suas metas, ou seja, promover ações para que toda criança brasileira venha a ter acesso ao programa (42). Após seus 11 anos de criação, muitos dos Estados brasileiros possuem condições de ampliar o número de doenças triadas.

O Laboratório APAE DE SÃO PAULO, baseado em dados da literatura, considera de suma importância a triagem da HAC-21OH e fazendo parte dos Serviços de Referência em Triagem Neonatal do PNTN possui uma abrangência grande de cobertura nas maternidades públicas de vários municípios do Estado, realizando a triagem de aproximadamente 30.000 Rns por mês. Contudo, torna-se imprescindível a otimização dos valores de

referência da N17OHP de acordo com o peso ao nascimento e com as novas metodologias disponíveis.

Em projeto piloto, o Laboratório do Serviço de Referência da APAE DE SÃO PAULO, em parceria com a Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), realizaram a padronização dos valores de referência da N17OHP em amostras de 67.640 Rns, divididos em quatro grupos de peso. Observamos que houve uma redução significativa dos valores falso-positivos (FP), de 5,2% para 0,5%, melhorando o valor preditivo positivo de um teste alterado (13); porém, apesar dos esforços, este valor ainda continua elevado, em torno de 2% (5) e com isso, requer que os Rns sejam submetidos a testes confirmatórios.

Em alguns países desenvolvidos como Suécia, Nova Zelândia e Japão, as amostras do papel de filtro dos recém-nascidos com resultados alterados são processadas novamente com técnica de extração com solvente específico e a N17OHP é, então, avaliada por cromatografia líquida com detecção por Espectrometria de Massas em Tandem (43-45). Esta metodologia tem a vantagem de ser mais específica, uma vez que não depende de reações antígeno-anticorpo para dosagem dos esteroides; sendo, portanto, menos susceptível à interferência de outros precursores da esteroidogênese. Porém, a técnica de extração do sangue do papel de filtro é diferente da utilizada no método imunofluorimétrico, não sendo disponível nos laboratórios que realizam o primeiro teste de triagem no Brasil. Além disso, uma quantidade significativa dos resultados falso-positivos ainda ocorre porque a N17OHP está verdadeiramente elevada no período neonatal em indivíduos não afetados pela HAC, mas com doenças intercorrentes (30).

No estudo piloto da APAE DE SÃO PAULO com o HC-FMUSP acima citado, foram utilizados como pontos de corte da N17OHP os valores correspondentes ao percentil 99,5, onde se observou resultados falso-positivos em aproximadamente 0,5% dos testes (13). Nesta série diagnosticamos apenas sete pacientes com a forma clássica e, exceto um caso, os valores da N17OHP na forma PS foram muito elevados, geralmente maiores do que 100 ng/mL. Entretanto, nos chamou a atenção um valor baixo da N17OHP (31

ng/mL) em Rn afetado com a forma PS, cuja amostra foi coletada no terceiro dia de vida (48 horas de vida). Outro ponto que gostaríamos de enfatizar foi que nesta amostra identificamos apenas um Rn afetado pela forma virilizante simples, cujo valor da N17OHP foi apenas moderadamente aumentado, 51 ng/mL. Limitações importantes deste estudo piloto foram: a) avaliar os dados de Rns de maternidades privadas, uma vez que casos com resultados positivos foram seguidos em diferentes centros, bem como a realização dos testes confirmatórios; b) número pequeno de prematuros triados e c) número pequeno de afetados pelas formas clássicas em todos os grupos de peso, o que limita a determinação dos valores preditivos positivos e negativos.

É importante ressaltar que alguns estudos discutem que coletas obtidas antes das 48 horas de vida não são úteis para a triagem neonatal, a não ser que os valores de referência sejam ajustados pelo tempo de vida no momento da coleta. Este dado baseia-se principalmente no fato de que nas coletas precoces, durante os dois primeiros dias de vida, aumentam a probabilidade de resultados falso-negativos (46, 47).

1.4. Testes Confirmatórios Hormonais

Os testes confirmatórios hormonais da triagem da HAC-21OH baseiam-se na dosagem dos esteroides em amostras de soro dos recém-nascidos com testes neonatais alterados. Diferentes metodologias são utilizadas na dosagem sérica da 17OHP, destacando-se o radioimunoensaio e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS). Esta última metodologia tem a vantagem de dosar simultaneamente mais de um composto esteroide, separando-os por peso molecular e não por reações antígeno-anticorpo, o que confere especificidade maior e interferência menor das reações cruzadas entre diferentes analitos (48-52).

No teste confirmatório, os recém-nascidos afetados pelas formas clássicas possuem valores muito elevados da 17OHP, sendo geralmente acima de 100 ng/mL na forma PS e maior do que 50 ng/mL na forma VS. Entretanto, 7 a 17% dos casos com resultados neonatais falso-positivos ainda não apresentam normalização da 17OHP no teste confirmatório sérico, quando a

dosagem é realizada por radioimunoensaio (5, 19). Estes Rns assintomáticos e que permanecem com resultados alterados no teste confirmatório necessitarão de seguimento clínico e laboratorial até que haja definição diagnóstica ou normalização da 17OHP sérica. Este procedimento eleva os custos para o sistema de saúde e causa ansiedade às famílias, o que evidencia a necessidade da padronização de testes confirmatórios com especificidade maior.

Tem sido proposto para a otimização dos testes confirmatórios, que o valor preditivo positivo (VPP) da concentração sérica elevada da 17OHP pode ser melhorado se interpretada em conjunto com outros esteroides, como cortisol, androstenediona e 21-deoxicortisol, possibilitando melhor especificidade diagnóstica (49). Adicionalmente, outras metodologias têm sido avaliadas, tais como a dosagem da 17OHP por LC-MS/MS, bem como a dosagem da androstenediona, cortisol, 21-deoxicortisol pelo mesmo método. Essa metodologia torna os valores de normalidade menores, sendo necessário o ajuste dos valores de referência (49, 53). Outra maneira de se melhorar significativamente o VPP dos testes confirmatórios é avaliar as razões entre os esteroides, tais como 17OHP/cortisol, androstenediona/cortisol, 17OHP+androstenediona/ cortisol e 17OHP+21-deoxicortisol/cortisol (5, 33, 49, 53).

O uso da relação 17-OHP/cortisol e androstenediona/cortisol baseia-se no fato de que a HAC não apresenta como única característica laboratorial o aumento da 17OHP, mas também incremento da concentração sérica de androstenediona em um contexto em que a síntese de cortisol está diminuída. Utilizando estas relações ao dosar estes esteroides por LC-MS/MS, estudo realizado em 2007 obteve redução da taxa de falso-positivos de 1% para 0,06% e incremento do VPP de 0,8% para 7,3% (53). Similarmente, dois outros estudos demonstraram um aumento significativo do VPP ao considerarem a relação 17OHP+androstenediona/cortisol, também utilizando como método de dosagem a LC-MS/MS (54, 55).

1.5. Testes Confirmatórios Moleculares

Além dos métodos hormonais de confirmação diagnóstica de um teste de triagem positivo, a pesquisa de mutações no gene da 21-hidroxilase (*CYP21A2*) tem também sido proposta como teste confirmatório, em análise de amostras de DNA do sangue periférico ou do papel de filtro (19, 56). A ideia é se utilizar a análise genética baseando-se no fato de que 90-95% dos Rns afetados são heterozigotos compostos ou homozigotos para um número limitado de mutações de ponto, deleções e rearranjos gênicos (9, 10). Este teste genético já foi avaliado em estudo conjunto da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP com o Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado de Goiás (APAE-Goiás), no qual foi verificada a eficácia elevada deste método. A pesquisa das mutações foi capaz de confirmar o diagnóstico neonatal em 21 dos 23 Rns afetados, predizendo a gravidade da forma clínica. Os outros dois Rns com testes positivos para HAC, mas sem a identificação de mutações no gene *CYP21A2*, constatou-se na reavaliação que eram portadores da deficiência da 11 β -hidroxilase. No mesmo estudo, em outros 19 Rns assintomáticos e com elevação persistente da 17OHP sérica, a análise molecular identificou genótipo que predizia a forma virilizante simples em três meninos e da forma não clássica em dois meninos, os quais devido à idade precoce ainda não apresentavam manifestações clínicas. Nos demais 14/19 Rns assintomáticos, por não apresentarem diagnóstico molecular da HAC-21OH, foi possível interromper o seguimento clínico (19).

1.6. Justificativa do Estudo

Em nosso estudo recente, demonstramos que a triagem neonatal da HAC-21OH foi eficiente em nosso meio ao detectar Rns afetados pela forma clássica padronizando-se pontos de corte da N17OHP de acordo com o peso ao nascimento (13). Porém, a utilização do percentil 99,5 como valor de referência para a N17OHP ainda gerou número significativo de resultados falso-positivos, tendo em conta a grande população do Estado de São Paulo. Outro ponto que nos chamou a atenção foi que um Rn afetado pela forma perdedora

de sal e com coleta neonatal precoce (48 horas de vida), teve valor da N17OHP mais baixo do que os demais.

Após dois anos de implementação da triagem neonatal da HAC-21OH no Estado torna-se importante reavaliar os seus critérios. Pretendemos analisar se os valores da N17OHP diferem significativamente em coletas realizadas no terceiro dia de vida daquelas coletadas a partir do quarto dia, o que tem importância, uma vez que os municípios do Estado apresentam tempos diferentes de coletas. Determinaremos também qual o percentil da N17OHP oferece taxa menor de resultados falso-positivos sem a perda do diagnóstico dos Rns verdadeiramente afetados nos diferentes grupos de peso ao nascimento e tempos de coleta. Os resultados dos testes neonatais serão validados por testes confirmatórios hormonais, usando a metodologia LC-MS/MS, e por testes confirmatórios moleculares.

Supomos que a padronização dos valores da 17OH-progesterona neonatal, de acordo com o peso ao nascimento e o tempo de vida no momento da coleta, reduzirá significativamente o índice de convocações por resultados falso-positivos e melhorará os valores preditivos positivos e negativos dos testes. Estes resultados ajudarão na viabilização do programa, além de melhorarem a relação custo/benefício do programa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Determinar de forma retrospectiva os valores de normalidade da 17OH-progesterona neonatal, padronizados de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida no momento da coleta em Rns triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) do Laboratório da APAE DE SÃO PAULO, a fim de se reduzir o número de convocações por resultados falso-positivos e de se viabilizar esta triagem para um programa público em todo território nacional.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar se os valores da N17OHP das coletas no terceiro dia de vida diferem significativamente daqueles com coletas a partir do quarto dia de vida;
- Determinar os valores de normalidade da N17OHP nos quatro grupos de peso ao nascimento, para amostras coletadas no terceiro dia de vida e após o quarto dia de vida;
- Determinar para cada grupo de peso ao nascimento e tempo de vida na coleta, qual percentil da N17OHP, usado como valor de referência, oferece taxa menor de resultados falso-positivos;
- Determinar a sensibilidade, especificidade, índice de convocação e os valores preditivos positivos e negativos da N17OHP em cada grupo de peso e tempo de coleta, para o diagnóstico das formas clássicas.

3. *METODOLOGIA*

3.1. Casuística

Este projeto foi submetido aos Comitês de Ética da APAE DE SÃO PAULO e da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP tendo sido aprovado com os números 332.548 e 324.462, respectivamente – CAAE: 16104013.6.0000.0068. O projeto foi parcialmente subsidiado por Auxílio Regular FAPESP nº2014/07878-4.

Dados de 271.810 recém-nascidos da cidade de São Paulo e região foram retrospectivamente avaliados, para os quais rotineiramente se realiza a triagem da HAC-21OH.

As amostras neonatais foram coletadas realizando-se punção no calcanhar do recém-nascido (Figura 4A) e o sangue depositado em papel filtro S&S 903® (Scheicher & Schuell) (Figura 4B) a partir do 3º ao 7º dia de vida idealmente, podendo se estender até 28º dia de vida do recém-nascido, conforme permitido pela Portaria nº 506 de 06/05/13. Todas as amostras foram submetidas à análise da N17OHP no Laboratório da APAE DE SÃO PAULO.

Figura 4. Coleta de amostra neonatal. A: punção lateral do calcâneo, B: impregnação da gota de sangue no papel filtro.

Os dados dos Rns foram divididos em dois grupos de acordo com a idade no momento da coleta: grupo G1 no terceiro dia de vida (48 - <72 horas) e grupo G2 a partir do quarto dia de vida (≥ 72 horas). Cada um desses grupos posteriormente foi subdividido em quatro grupos de acordo com o peso ao nascimento: P1: $\leq 1.500\text{g}$, P2: $1.501 - 2.000\text{g}$, P3: $2.001 - 2.500\text{g}$ e P4 $> 2.500\text{g}$.

3.2. Dosagens Laboratoriais

Após a coleta de sangue e processo de secagem do papel de filtro, as dosagens da N17OHP de 271.810 Rns foram analisadas pelo método imunofluorimétrico – B024-112 – Auto Delfia – *Neonatal 17 α -hidroxi-progesterona (17OHP) – Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Wallac Oy, Turku, Finland.*

O *kit* Auto Delfia 17 α -hidroxi-progesterona é um fluoroimunoensaio por tempo resolvido em fase sólida com base na reação competitiva entre o 17OHP marcado com o európio e a amostra contendo 17OHP, para um número limitado de sítios de ligação nos anticorpos policlonais específicos (derivados de coelho). A precisão do *kit* foi determinada de acordo com o documento da NCCLS – EP5-A2 (57), segundo seu fabricante. As reações cruzadas com este método foram menores do que as realizadas com o radioimunoensaio, sendo 3,6% com a progesterona e 0,13% com a 17OH-pregnenolona (58). Os coeficientes de variação inter-ensaio e intra-ensaio foram realizados sob controle do CDC – *Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA – Newborn Screening Quality Assurance Program.* Os resultados das amostras de sangue coletadas foram liberados em soro equivalência e os fatores de conversão estão descritos abaixo.

Fatores de conversão	=	1 nmol/L = 0,33 ng/mL sangue
		1 nmol/L = 0,73 ng/mL soro

Recém-nascidos com valores alterados da N17OHP foram reavaliados conforme descrito a seguir:

- a) Aqueles com concentrações da N17OHP acima do valor de corte para o grupo de peso (correspondente ao percentil 99,5, de acordo com o protocolo do Estado de São Paulo) (59), foram submetidos à segunda coleta de sangue em papel filtro para confirmação do resultado. Nos casos em que os resultados se mantiveram elevados, os Rns foram convocados para realizar o teste confirmatório para dosagem sérica da 17OHP, androstenediona e cortisol, utilizando-se a metodologia de Cromatografia Líquida acoplada ao Tandem (LC - MS/MS - *Waters Xevo TQ-S®, EUA*) e testosterona utilizando-se o método eletroquimioluminescência. Os coeficientes de variação inter e intraensaio foram menores do que 8%. Também foram dosados sódio e potássio no soro pelo método de eletrodo íon seletivo. Para a maioria dos Rns, os testes confirmatórios séricos foram realizados no LIM 42, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular do Hospital das Clínicas - FMUSP.
- b) Aqueles com N17OHP muito elevada, isto é, acima de 2x o percentil de normalidade para o grupo de peso ao nascimento, a convocação foi imediata com a coleta dos testes confirmatórios séricos e consulta em Centro de Referência de Tratamento da Hiperplasia Adrenal Congênita.

Os recém-nascidos com valores da 17OHP séricos persistentemente elevados e sem manifestações clínicas foram mantidos em acompanhamento nos Centros de Referência em Tratamento da HAC-21OH ou no Ambulatório da APAE DE SÃO PAULO, até apresentarem normalização dos exames séricos ou receberem resultado do estudo molecular que exclui a HAC-21OH.

Todas as convocações foram realizadas pela Busca Ativa, setor responsável em captar todos os bebês que obtiveram resultados alterados na triagem neonatal.

O diagnóstico das formas PS e VS da HAC-21OH foram estabelecidos pela análise conjunta do exame físico com as dosagens séricas. Estudo prévio de pacientes em acompanhamento no Hospital das Clínicas demonstrou que pacientes afetados pelas formas clássicas apresentam valores da 17OHP séricas geralmente maiores do que 50 ng/mL (24). No sexo feminino, para se

comprovar o diagnóstico da forma clássica, foi pesquisada a presença de virilização da genitália externa e quantificada pela escala de Prader (60). A presença de perda de peso e/ou desidratação com hiponatremia indicaram o diagnóstico da forma perdedora de sal, em ambos os sexos. Todos os pacientes com o diagnóstico da forma clássica foram imediatamente submetidos à terapia de reposição hormonal com acetato de cortisona e/ou fludrocortisona, de acordo com a forma clínica. Porém, Rns com a forma perdedora de sal e com diagnóstico precoce, podem ter valores normais de sódio e potássio, não sendo possível nesta fase a diferenciação com a forma virilizante simples. Nestes casos, foram também instituídas doses baixas de fludrocortisona e avaliação semanal de sódio. Estas medicações foram fornecidas pela Farmácia do Hospital das Clínicas - FMUSP, que as possui padronizadas em seu serviço.

Durante o seguimento dos casos afetados e indeterminados (assintomáticos com exames séricos alterados) foi realizado o estudo molecular, aqueles com ausência de mutações em um ou ambos os alelos foram considerados não afetados e receberam alta do seguimento.

3.3. Estudo Molecular do Gene *CYP21A2*

O DNA genômico foi extraído de leucócitos periféricos pela técnica *salting-out*. A concentração do DNA foi obtida através de leitura em espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Suécia) no comprimento de onda 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/mL). Utilizamos a razão 260/280 >1,8 como ideal de pureza do DNA. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar sua integridade e estocadas a 4 °C até a sua utilização.

O gene *CYP21A2* foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos, evitando amplificação do pseudogene. Esta especificidade foi obtida através da utilização de *primers* localizados no exon 3 que não contem a deleção de oito nucleotídeos característica do pseudogene. Os *primers* utilizados foram P1, P48, P4 e P55 de acordo com protocolo previamente publicado (61).

Os produtos de PCR foram purificados através de pré-tratamento enzimático com 2 µL de ExoSAP-IT (*USB Corporation, Cleveland, OH, USA*), para cada 50 ng de massa de DNA, conforme instruções do fabricante. Em seguida, o produto de PCR purificado foi submetido à reação de sequenciamento utilizando-se o *Kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) com 5 pmol de *primers* específicos (61). Para o ensaio de sequenciamento, foi utilizado o termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) seguindo o protocolo com 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA e os eletroferogramas foram analisados através do *software ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os resultados obtidos foram comparados com a respectiva sequência selvagem obtida do *Gene Bank*, *Ensembl ID*: ENSG00000231852.

3.4. Análise Estatística

Os dados numéricos foram apresentados como medianas, variação por faixas e percentil visto que as variáveis não apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A mediana dos valores da N17OHP entre os grupos G1 e G2 e para cada grupo de peso foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

Os valores de corte para a N17OHP foram estabelecidos para cada grupo de peso ao nascimento (P1 a P4) e de acordo com o tempo de vida no momento da coleta (grupos G1 e G2), utilizando-se o percentil 99,5 (atualmente utilizado no Programa de Triagem Neonatal do Estado de São Paulo) e também para o percentil 99,8. Foram utilizados os softwares Sigma Stat v.3.5 para Windows e planilhas de Excel para Windows.

Utilizando cada um dos valores de corte acima referidos, foram calculados: porcentagem de resultados falso-positivos, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos.

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos foram definidos da seguinte forma:

- A **sensibilidade** (S) é a capacidade de um exame de detectar a HAC-21OH quando presente; medida pela proporção dos indivíduos com a doença que tem um resultado positivo, sobre todos os indivíduos com a doença que foram submetidos ao teste.
- A **especificidade** (E) é a capacidade de um exame de identificar corretamente a ausência de HAC-21OH; medida pela proporção entre indivíduos sem a doença que tem um resultado negativo e todos os indivíduos sem a doença que foram submetidos ao teste.
- **Valor Preditivo Positivo** (VPP) é a probabilidade da presença da HAC-21OH dado o resultado de um teste. O VPP é, portanto, a probabilidade da doença em um paciente com o resultado de um teste positivo (anormal).
- **Valor Preditivo Negativo** (VPN) é a probabilidade de não ter a doença quando o resultado do teste for negativo (normal).

$$\text{Sensibilidade} = VP/(VP+FN)$$

$$\text{Especificidade} = VN/(VN+FP)$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = VP/(VP+FP)$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = VN/(VN+FN)$$

VP: verdadeiro-positivo; FN: falso-negativo;

FP: falso-positivo; VN: verdadeiro-negativo

4. RESULTADOS

Durante o estudo, 271.810 recém-nascidos foram submetidos à triagem, sendo que 214.092 amostras (78,8%) foram coletadas no terceiro dia de vida (grupo G1) e 57.718 (21,2%) após o terceiro dia (grupo G2). Em G1, 466, 1.763, 13.527 e 198.336 recém-nascidos pertenciam aos sub-grupos P1, P2, P3 e P4, respectivamente; em G2, 3.583, 6.502, 6.813 e 40.820 pertenciam aos grupos P1, P2, P3 e P4, respectivamente.

No grupo G1, a mediana e intervalos interquartis dos valores da N17OHP nos grupos de peso P1, P2, P3 e P4 foram de 12,9 (6,3 - 26,6), 8,2 (5,3 - 13,4), 6,7 (4,8 - 9,5) e 5,2 (3,9 - 7,0) ng/mL, respectivamente, e no grupo G2 foram de 13,4 (7,7 - 25,1), 8,9 (5,6 - 14,8), 6,9 (4,5 - 11,1) e 3,9 (2,7 - 5,5) ng/mL, respectivamente. Os valores da N17OHP diferiram significativamente de acordo com o tempo de vida no momento da coleta (entre os grupos G1 e G2), em todos os grupos de peso ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1. Mediana e intervalo interquartil da N17OHP (ng/mL) de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.

Peso (gramas)	Grupo G1 (<72h)			Grupo G2 (≥72h)			p^*
	Rn (n)	Mediana	IQ	Rn (n)	Mediana	IQ	
P1	466	12,9	(6,3-26,6)	3.583	13,4	(7,7-25,1)	<0,001
P2	1.763	8,2	(5,3-13,4)	6.502	8,9	(5,6-14,8)	<0,001
P3	13.527	6,7	(4,8-9,5)	6.813	6,9	(4,5-11,1)	<0,001
P4	198.336	5,2	(3,9-7,0)	40.820	3,9	(2,7-5,5)	<0,001

IQ - Intervalo interquartil; P1: ≤ 1500g; P2: 1501-2000g; P3: 2001-2500g; P4: >2500g

Foram determinados os valores de referência da N17OHP usando os diferentes percentis, 99,5 e 99,8, de acordo com o tempo de vida no momento da coleta da amostra, para cada grupo de peso, estando descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de corte da N17OHP (ng/mL) utilizando-se os percentis 99,5 e 99,8 de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.

Peso (gramas)	Grupo G1 (< 72h)			Grupo G2 (≥ 72h)		
	Rn	99,5	99,8	Rn	99,5	99,8
	(n)	(ng/mL)	(ng/mL)	(n)	(ng/mL)	(ng/mL)
P1	466	110	120	3.583	147	173
P2	1.763	56	71	6.502	69	90
P3	13.527	32	39	6.813	48	66
P4	198.336	17	20	40.820	20	25
Total	214.092			57.718		

P1: ≤ 1500g; P2: 1501-2000g; P3: 2001-2500g; P4: >2500g

4.1. Valores da N17OHP de Recém-Nascidos Afetados por HAC-21OH

Para se determinar o valor diagnóstico dos pontos de corte acima mencionados, foram avaliados os valores da N17OHP dos Rns verdadeiramente afetados pelas formas clássicas da HAC-21OH (Tabela 3). A N17OHP variou de 31,1 a 736,6 ng/ mL (Figura 5). No entanto, vale a pena ressaltar que um deles, com valor baixo da N17OHP (27,7 ng/mL), já estava recebendo terapia de reposição com glicocorticoide no momento da coleta da amostra neonatal, este teve seu diagnóstico firmado na maternidade pela presença de atipia genital (caso 11, Tabela 3) e seus dados foram excluídos das análises.

Vinte e seis pacientes apresentaram a forma PS no grupo G1 (13M e 13F), os valores da N17OHP variaram de 31,1 ng/mL a 524,2 ng/mL. No grupo G2, 20 pacientes apresentaram a forma PS (8M e 12F) e os valores da N17OHP variaram de 53,1 ng/ml a 736,6 ng/ml. Nos grupos G1 e G2 um total de três pacientes com a forma VS foi diagnosticado (1M e 2F) e os valores da N17OHP variaram de 36,6 a 51,8 ng/mL (casos 8, 27 e 45; Tabela 3).

Surpreendentemente, apenas o diagnóstico da triagem possibilitou o diagnóstico de 3 Rns 46,XX, uma vez que nestas a atipia genital não foi adequadamente identificada no berçário. Em uma delas, apesar da ausência de testículos palpáveis, foi atribuído sexo social masculino por apresentar Prader V (paciente 9, Tabela 3). No paciente 13, a virilização genital leve (Prader II) também não foi observada, embora tenha sido corretamente designada no sexo social feminino. Na terceira paciente com a forma PS (paciente 28), embora a atipia genital tenha sido reconhecida ao nascimento, nenhuma investigação adicional foi realizada antes do resultado da triagem neonatal. Nestes três casos, apesar desta evidente manifestação clínica, apenas o resultado da triagem permitiu a identificação precoce da forma perdedora de sal.

Com relação ao diagnóstico pela triagem e a prevenção da crise de perda de sal, observou-se que quando os resultados se tornaram disponíveis, dois pacientes PS já estavam recebendo terapia com glicocorticoide e mineralocorticoide (pacientes 11 e 19), outros dois apresentaram desidratação hiponatrêmica grave (pacientes 6 e 29) e, nos demais a instituição da terapia evitou a desidratação. A mediana dos valores séricos de sódio e potássio foram 127 mEq/L e 7,3 mEq/L, respectivamente. Durante o período do estudo não foram reportadas mortes por crise perdedora de sal.

Tabela 3. Valores da N17OHP (ng/mL) de recém-nascidos com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH diagnosticados pela triagem neonatal

Paciente	Sexo	Peso (gramas)	Tempo de vida (hs)	N17OHP (ng/mL)	Forma Clínica
1	F	2470	48:00	42,2	PS
2	F	3155	48:00	77,5	PS
3	F	4430	48:00	275,6	PS
4	F	2880	48:00	469,2	PS
5	M	3990	48:00	524,2	PS
6	M	2910	48:03	221,5	PS
7	M	3765	48:06	258,9	PS
8	M	2950	48:10	36,6	VS
9	F	3470	48:12	276,0	PS
10	M	3335	48:13	95,4	PS
11	F	3620	48:18	27,7*	PS
12	M	3200	48:20	330,0	PS
13	F	2950	48:20	31,1	PS
14	M	2360	48:23	322,6	PS
15	M	3270	48:29	199,8	PS
16	M	3200	48:30	394,3	PS
17	M	2540	48:36	304,0	PS
18	F	3856	49:00	180,4	PS
19	F	3985	49:00	127,0*	PS
20	M	3205	49:40	137,7	PS
21	M	3620	49:51	52,8	PS
22	M	3580	51:06	410,9	PS
23	F	3610	56:15	260,8	PS
24	M	3650	56:25	231,2	PS
25	F	4020	57:20	264,5	PS
26	F	3740	61:21	119,9	PS
27	F	3340	65:08	51,8	VS
28	F	3340	65:35	397,0	PS
29	M	3650	78:30	480,3	PS
30	F	3540	79:39	164,4	PS
31	M	2170	81:06	218,9	PS
32	F	3445	82:36	222,0	PS
33	M	1825	84:12	379,6	PS
34	F	2655	85:00	444,0	PS
35	F	3835	85:11	53,1	PS
36	F	3095	90:46	396,1	PS
37	M	2690	92:05	98,3	PS
38	F	3440	92:09	736,6	PS
39	F	3150	92:16	489,4	PS
40	F	3885	92:19	163,1	PS
41	F	2090	101:10	369,8	PS
42	M	3465	101:50	320,0	PS
43	M	2430	103:27	115,0	PS
44	M	3350	154:39	384,0	PS
45	F	2860	165:00	48,8	VS
46	F	2268	175:25	387,1	PS
47	M	2455	191:45	494,0	PS
48	F	3255	192:05	20,6	NC
49	F	2600	317:42	437,0	PS
50	F	3195	391:02	452,0	PS
51	M	4094	5322:17	95,0	NC

PS: forma perdedora de sal; VS: forma virilizante simples; NC: forma não clássica;

*Rn em uso de terapia com glicocorticoide no momento da coleta da amostra neonatal

Figura 5. Valores da N17OHP (ng/mL) dos Rns afetados com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH, de acordo com o tempo de vida na coleta.

4.2. 17OH-Progesterona Neonatal de Recém-Nascidos com Resultados Falso-Positivos

Utilizando-se o valor de corte da N17OHP correspondente ao percentil 99,5, observou-se que 1143 (0,53%) testes teriam valores alterados, ou seja, RFP para o grupo G1 e 290 (0,5%) testes para o grupo G2. Utilizando-se o valor de corte da N17OHP para o percentil 99,8, este número diminuiria para 470 (0,21%) testes no grupo G1 e 121 (0,2%) testes no grupo G2, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de resultados falso-positivos utilizando-se valores de referência da N17OHP para coletas realizadas nos grupos G1 (< 72h de vida) e G2 (após ≥ 72h), de acordo com o peso ao nascimento nos percentis 99,5 e 99,8.

Peso (gramas)	Grupo G1 (< 72h)			Grupo G2 (≥ 72h)		
	Rn	99,5	99,8	Rn	99,5	99,8
	(n)	(%)	(%)	(n)	(%)	(%)
P1	466	0,64	0,21	3.583	0,21	0,08
P2	1.763	0,51	0,22	6.502	0,53	0,21
P3	13.527	0,48	0,22	6.813	0,51	0,19
P4	198.336	0,53	0,21	40.820	0,51	0,22
Total	214.092	0,53	0,21	57.718	0,5	0,2

P1: ≤ 1500g; P2: 1501-2000g; P3: 2001-2500g; P4: >2500g

Dentre os casos com RFP, oito deles apresentaram valores muito elevados da N17OHP; em 4/8 Rns (valores de 498,4 a 699,9 ng/mL) ocorreu erro metodológico no procedimento de coleta das amostras, devido à utilização de sangue periférico estocado em tubos com EDTA. Nos restantes quatro casos (valores de 163,3 a 384,2 ng/mL), os Rns estavam na unidade de terapia intensiva com insuficiência respiratória grave e/ou sepse. Este grupo também compreendeu 29 casos assintomáticos e com valores alterados da N17OHP, que no seguimento também mantiveram valores alterados da 17OHP sérica.

Os valores da N17OHP (ng/mL) dos testes com RFP para o percentil 99,5 e 99,8, de acordo com a idade na coleta e peso ao nascimento estão representados nas Figuras 6 e 7.

Figura 6. Valores da N17OHP (ng/mL) de testes com resultados falso-positivos tomando-se como valor de referência o percentil 99,5, de acordo com peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.

Figura 7. Valores da N17OHP (ng/mL) de testes com resultados falso-positivos tomando-se como valor de referência o percentil 99,8, de acordo com o peso ao nascimento e tempo de vida na coleta.

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo correspondentes aos percentis 99,5 e 99,8 para cada grupo de idade (G1 e G2) e peso ao nascimento (P1- 4) estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Sensibilidade (%), especificidade (%), valores preditivos positivo e negativo (%) foram definidos para os grupos G1 e G2 e para cada grupo de peso ao nascimento tendo em conta os percentis 99,5 e 99,8.

	Grupo G1 (<72h)				Grupo G2 (≥ 72h)			
	S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN
99,5								
P1	NA	99,3	NA	100	NA	99,7	NA	100
P2	NA	99,4	NA	100	100	99,4	2,7	100
P3	100	99,5	2,9	100	100	99,4	12,5	100
P4	100	99,4	2,3	100	100	99,4	7,0	100
99,8								
P1	NA	99,7	NA	100	NA	99,9	NA	100
P2	NA	99,7	NA	100	100	99,7	6,6	100
P3	100	99,7	6,2	100	100	99,8	27,7	100
P4	100	99,7	5,6	100	100	99,7	14,1	100

P1: ≤ 1500; P2: 1501-2000; P3: 2001-2500 ; P4: >2500 Sensibilidade (S); Especificidade (E); Valor Preditivo Positivo (VPP); Valores Preditivos Negativos (VPN) ; NA: não se aplica, nenhum bebê com HAC-21OH foi diagnosticado neste grupo.

4.3. Testes Confirmatórios: Hormonal Sérico e Molecular

Considerando o percentil 99,5 (G1: n= 1.145; G2: n= 312), os Rns convocados por teste neonatal alterado, realizaram, na sua maioria os testes confirmatórios séricos no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42) da Disciplina de Endocrinologia, FMUSP.

A mediana das concentrações séricas da 17OHP nos casos com HAC-21OH foi de: 17OHP 130,5 ng/mL (25 - 668), enquanto que da testosterona foi de 192 (17 – 1539) ng/dL, do cortisol foi 3,4 mcg/mL (1,7 – 16,7), da androstenediona foi 5,1 ng/mL (0,49 – 21,6), do sódio foi 127 (95 - 136) mEq/L e do potássio foi de 7,3 (5,3 - 10) mEq/L. A mediana da concentração sérica da 17OHP dos casos falsos positivos foi de 3,9 ng/mL (2 - 20).

Utilizando-se como teste confirmatório a dosagem da 17OHP por LC-MS/MS, observou-se que a maioria dos Rns apresentou resultado normalizado, 98,2% das amostras no grupo G1 e 95,3% no grupo G2. No entanto, 29 Rns assintomáticos que mantiveram 17OHP sérica persistentemente elevada, foram acompanhados e/ou submetidos ao estudo molecular. Nove/29 normalizaram a 17OHP sérica durante o seguimento e para os demais 20 casos foi solicitado o encaminhamento ao centro de referência para o estudo molecular. Destes 20 casos, apenas seis coletaram amostras de DNA, sendo que em dois deles foi diagnosticado a forma não clássica (casos 48 e 51 – Tabela 6), nos quais os valores da N17OHP foram de 20,6 e 95,0 ng/mL. Os quatro casos restantes tiveram alta do seguimento por apresentarem estudo molecular compatível com não afetado.

Dentre os 49 Rns afetados pela forma clássica, apenas 14 responderam ao pedido de coleta de amostras de DNA para o estudo molecular, cujos resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Genótipo, forma clínica predita pelo genótipo e forma clínica apresentada em recém-nascidos com as diferentes formas clínicas da HAC-21OH

Paciente	Sexo	N17OHP (ng/mL)	Genótipo <i>CYP21A2</i>	Forma Predita	Forma Apresentada
5	M	524	I2splice ,V281L / Q318X	PS	PS
6	M	222	I2splice / Q318X, R356W	PS/VS	PS
8	M	36	I172N / G424S	VS	VS
9	F	276	IVS2-2A>G / I2 splice	PS/VS	PS
13	F	31	I172N / IVS2-2A>G	VS	PS
15	M	199	I2splice / R356W	PS/VS	PS
21	M	53	I172N / InsT,Q318X,R356W	PS/VS	PS
24	M	231	I2 splice / I2 splice	PS/VS	PS
32	F	222	Conv / I2 splice	PS/VS	PS
35	F	53	I2splice / I172N	PS/VS	PS
39	F	489	Conv / I236N, Cluster, R483W	PS	PS
44	M	384	R356W / Deleção <i>CYP21A2</i>	PS/VS	PS
45	F	48	I2splice / R426H	PS/VS	VS
48	F	20	Q318X,R356W/-*	NC/NL	NC
50	F	452	Q318X / Q318X	PS	PS
51	M	95	R426H / V281L	NC	NC

Forma predita: forma clínica predita pelo genótipo. Forma apresentada: forma clínica apresentada. PS: perdedor de sal; VS: virilizante simples; M: masculino; F: feminino; Conv: conversão; Ins: inserção; *: não foi identificada mutação; NL: normal

5. DISCUSSÃO

Os programas de triagem neonatal têm como objetivo prevenir mortes e sequelas com base no diagnóstico precoce de doenças que poderiam passar despercebidas, por serem oligossintomáticas durante o período neonatal (42).

Como o objetivo de uma triagem populacional é detectar de forma precoce a doença para introduzir o tratamento em sua fase ainda assintomática, a coleta dentro do prazo sugerido, o encaminhamento dessas amostras ao laboratório, a convocação dos Rns com valores da N17OHP suspeitos para coleta dos testes confirmatórios são de grande importância para que a triagem neonatal atinja o seu objetivo maior (42).

Considerando que o Laboratório da APAE DE SÃO PAULO e a Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP realizam consultoria na introdução da triagem neonatal da HAC para a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo e Ministério da Saúde, respectivamente, os resultados desta pesquisa poderão ser aplicados na prática clínica. Neste estudo retrospectivo com aproximadamente 270.000 recém-nascidos, esperamos que a padronização dos valores de referência da 17OHP neonatal ajustados em quatro grupos de peso ao nascimento e com o tempo de vida no momento da coleta possa contribuir com redução significativa na frequência de resultados falso-positivos, bem como na melhora dos valores preditivos positivo e negativo.

Apesar da grande miscigenação da população brasileira, estudos anteriores demonstraram que a HAC-21OH tem frequência elevada no Brasil (13, 21, 39). Adicionalmente, nossos dados demonstraram que a triagem da HAC-21OH em São Paulo foi eficaz na identificação da forma perdedora de sal, aumentando a proporção de 2 para 4:1, esperada entre as formas perdedora de sal e virilizante simples. Identificamos também normalização da distribuição entre os sexos (1F:1M), em se tratando de doença com herança autossômica recessiva. Estes dados do Estado de São Paulo estão de acordo com os de outras casuísticas (5, 19, 43). Resultados semelhantes a estes fizeram com que programas de triagem neonatal em vários países incluíssem o diagnóstico da HAC-21OH, por ser mais fácil e rápido se diagnosticar pela TN do que se identificar os recém-nascidos por sinais clínicos (8, 62-65).

Porém, na implementação de uma triagem torna-se importante a determinação de pontos de corte, suficientemente elevados para se minimizar

RFP, mas não tão elevados para se evitar a perda do diagnóstico de um caso verdadeiramente afetado. Tendo em conta esses parâmetros, verificamos alguns Rns afetados com valores pouco aumentados da N17OHP, tanto em portadores da forma VS quanto da forma PS. Estes Rns possuíam em comum coletas neonatais no terceiro dia de vida (entre 48 e 72 horas de vida).

Na literatura, é conhecido que os valores da N17OHP aumentam com o tempo em Rns afetados, sabendo-se que as coletas realizadas antes dos dois primeiros dias de vida podem reduzir a precisão diagnóstica (46, 66). Porém, no nosso conhecimento, nenhum estudo comparou se os valores de coletas da N17OHP do terceiro dia de vida diferem dos valores das coletas após. O conhecimento desse dado é essencial, considerando que na capital, em função do Programa Mãe Paulistana da Prefeitura de São Paulo, as mães recebem alta após as 48 horas de vida do bebê, a fim de se diminuir a morbi/mortalidade perinatal (67). Este protocolo permite aumento significativo da cobertura do programa de triagem. Porém, nos outros municípios, bem como em todo o Brasil, a mãe recebe alta precoce, devendo apresentar-se em até uma semana de vida do bebê no posto mais próximo à sua residência para a coleta do teste do pezinho.

De acordo com a nossa hipótese inicial, observamos que a mediana dos valores da N17OHP no terceiro dia de vida estavam significativamente menores do que as coletas mais tardias em todos os grupos de peso, gerando a necessidade de se padronizar diferentes pontos de corte de acordo também com o tempo de vida na coleta e não só com o grupo de peso como inicialmente proposto em estudo piloto em 2011 (13). Esperamos que essa nova padronização possa evitar resultados falso-negativos, especialmente para a forma PS. No nosso meio já existe um trabalho publicado recentemente, do programa de Santa Catarina, que padronizou os valores de corte da N17OHP; porém, não pudemos realizar uma avaliação comparativa, pois os parâmetros utilizados em relação ao tempo de coleta (média 7 dias de vida), metodologia e equipamentos são diferentes do nosso estudo (68).

Apesar da triagem da HAC-21OH ser altamente eficaz no diagnóstico da forma PS, um de seus principais problemas é a taxa elevada de RFP, observada especialmente entre os recém-nascidos com peso baixo ao

nascimento e/ou prematuridade. Estes últimos podem apresentar elevação significativa nos valores da N17OHP por imaturidade enzimática da adrenal, capacidade menor de 11-hidroxilação, concentrações elevadas de ácido glucurônico e reação cruzada com outros metabólitos esteroides conjugados na circulação (19, 69, 70).

Para minimizar esse efeito, diversos países têm realizado ajustes nos valores de referência da N17OHP de acordo com a idade gestacional e/ou peso ao nascimento (6, 40, 70-72). A nossa escolha pelo critério peso ao nascimento, ao invés da idade gestacional, se deve ao fato da informação ser mais confiável e precisa do que a idade gestacional informada pelas mães; uma vez que no nosso programa público não se realiza rotineiramente ultrasson obstétrico para se aferir a idade gestacional. Consequentemente, para melhorarmos a *performance* da triagem neonatal, avaliamos os valores da N17OHP para cada grupo de peso em ambos os tempos de coleta. De forma similar ao descrito na literatura (46), observamos que os valores da N17OHP aumentaram significativamente quanto mais baixo era o peso ao nascimento. Conforme publicado anteriormente (13), este dado se replicou em ambos os grupos de acordo com o tempo de coleta, G1 e G2.

O próximo passo foi a determinação dos valores de corte para a N17OHP de acordo com o tempo de coleta (G1 e G2) e grupo de peso (P1 a P4). Foram determinados os valores de corte correspondentes ao percentil 99,5 (preconizado no protocolo de triagem neonatal do Estado de São Paulo) (59). No entanto, a taxa global de RFP (0,5%) ainda manteve-se elevada para um programa com aproximadamente 600.000 nascimentos/ano, sendo mais expressiva no grupo de extremo prematuro, nascido com menos do que 1500 gramas (73).

Subsequentemente, determinamos os valores de corte da N17OHP para o percentil 99,8, os quais parecem mais adequados para o nosso PNTN, uma vez que a taxa de RFP (0,2%) está de acordo com estudos anteriores (13, 40, 71, 72). Vale a pena ressaltar que a maior redução de RFP ocorreu no grupo de extremo baixo peso ao nascimento.

Apesar da significativa redução de RFP, este estudo também identificou resultados falso-positivos por erros metodológicos, na técnica de coleta da

amostra neonatal. Em 4 dos 8 resultados falso-positivo e com valores extremamente elevados (498,4 a 699,9 ng/mL), o procedimento de coleta da foi com sangue de veia periférica em tubos com EDTA, antes de ser transferido para o papel de filtro. O EDTA quebra o estado do európio usado no *kit* imunofluorimétrico resultando em uma contagem baixa que por sua vez, por ser um ensaio inversamente proporcional, resulta em valores da N17OHP extremamente elevados. Esta constatação reforça a necessidade de educação contínua dos profissionais em nosso programa de triagem neonatal. Os demais 4 casos com valores extremos (163,3-384,2 ng/mL) apresentaram problemas graves de saúde e dois deles receberam alta após o sequenciamento do gene *CYP21A2*, que afastou a presença de mutações.

Na análise dos valores da N17OHP de RNs verdadeiramente afetados, identificamos afetados pelas formas clássicas apenas nos grupos P2, P3 e P4, isto é, todos com mais do que 1.500 gramas de peso ao nascimento. Os valores da N17OHP dos Rns perdedores de sal foi muito elevado, exceto em três casos com coletas entre 48 e 49 horas de vida que tiveram valores moderadamente aumentados, menores do que 53 ng/mL. Consideramos que ainda não identificamos nenhum afetado no grupo de extremo prematuro (Rns abaixo de 1500 g ao nascimento) pelo fato deste grupo conter número pequeno de Rns triados. Supomos que seja pouco provável que tivemos perda de diagnóstico, uma vez que estes Rns permanecem internados nas UTIs neonatais por longo período, sendo submetidos frequentemente a monitoramento das concentrações séricas de sódio e potássio.

Na análise dos valores da N17OHP dos Rns afetados pela forma VS, observamos valores moderadamente aumentados e os três casos seriam identificados utilizando-se tanto os valores de corte do percentil 99,5, como do 99,8. Logo, nossos resultados preliminares sugerem que a utilização dos valores de corte da N17OHP de acordo com o percentil 99,8, além da diminuição da taxa de RFP, também não resultaria em resultados falso-negativos.

Porém, ressaltamos a proporção baixa de casos com a forma VS (6%) diagnosticados neste estudo e não podemos descartar um efeito no tamanho da amostra. Discute-se que a triagem neonatal pode não identificar todos os

casos com a forma VS, para melhorar a sensibilidade diagnóstica alguns serviços realizam uma segunda coleta com aproximadamente 1 a 2 semanas de vida (29). Porém, consideramos que a coleta indiscriminada de uma segunda amostra resultaria em custo inviável para o tamanho de programa de saúde pública como o do Brasil. Em países desenvolvidos, este subgrupo de pacientes não faz parte do principal objetivo dos programas de triagem neonatal, pois são precocemente diagnosticados na vida pós-natal pelas manifestações de virilização, incluindo as meninas, nas quais a grande maioria tem a atipia genital identificada no berçário (12, 74).

Na literatura, a fim de se tornar uma triagem custo-efetiva, discute-se que a dosagem da N17OHP deveria ser realizada apenas para os Rns de sexo masculino, uma vez que as meninas são geralmente diagnosticadas precocemente pela presença da atipia genital (75). Até mesmo a forma perdedora de sal possui alto índice diagnóstico no período neonatal em casuísticas sem triagem, como a da Finlândia e Reino Unido, nas quais mais do que 90% dos Rns foram diagnosticados por meios clínicos (76, 77). Entretanto, ressaltamos que esses dados são de países desenvolvidos, sendo a realidade diferente de países em desenvolvimento, como o Brasil. Observamos que, na casuística do Hospital das Clínicas do Estado de São Paulo, na qual as pacientes foram diagnosticadas por meios clínicos, que em 40% delas a atipia genital não foi identificada ao nascimento e que em 11,5% destas houve erro de identificação de sexo civil ao nascimento (dados não publicados). Supomos que esta falha diagnóstica possa ser ainda maior em Estados mais carentes e os dados preliminares deste estudo sugerem que o sexo feminino também deva ser triado em nosso meio.

Após todos os ajustes acima mencionados para a N17OHP, peso ao nascimento e tempo de vida no momento da coleta, observamos que o VPP de um teste alterado subiu significativamente quando se comparou os valores de corte do percentil 99,5 com os do percentil 99,8, sendo de 5,6% para os Rns de termo com coleta no grupo G1 e de 14% para os com coleta do grupo G2. Apesar da sensibilidade de 100% para todos os grupos de peso e da melhora melhora do VPP, este valor ainda é baixo quando se utiliza o método

imunofluorimétrico, em conformidade com os dados prévios da literatura (43, 78).

Uma vez que no grupo de extremo prematuro não identificamos nenhum Rn afetado pela forma clássica, não pudemos calcular o VPP de um teste alterado com a nova estratificação de peso ao nascimento e tempo de coleta. Ainda é controverso na literatura se este grupo de Rn deveria ser submetido a triagem da HAC-21OH, uma vez que o VPP deste grupo também é baixo, variando de 0,4% a 5,9% (43). Considerando o longo tempo de permanência destes Rns no hospital, poderiam ser diagnosticados por meios clínicos.

Sabe-se que a espectrometria de massa, "padrão ouro" para dosagem dos esteroides, minimiza a reação cruzada com outros esteróides, melhorando significativamente o VPP de um teste alterado (53, 79). No entanto, a utilização em larga escala da espectrometria de massa apresenta desafios, sendo um deles o custo elevado na aquisição dos equipamentos e o custo operacional (80). Desta forma, muitos serviços reservam o uso da espectrometria de massa para um reteste de amostra com o primeiro resultado neonatal alterado, pelo uso inicial do método imunofluorimétrico ou ELISA. Em Rns de termo o VPP varia de aproximadamente 50% a 60% com a Espectrometria de Massas (55, 79). A Alemanha acrescenta a análise de um perfil esteroidal, avaliando a razão N17OHP+21-Deoxicortisol/cortisol, subindo o VPP para 100%. Com esta razão, todos os Rns não afetados, incluindo-se os pré-termos, apresentaram relação $< 0,07$ e todos os Rns afetados HAC-21OH tinham valores $> 0,53$ (60). Embora estas análises aumentem significativamente os custos da triagem, tem que ser levado em conta os custos da reconvocação de um Rn com RFP.

Não avaliamos a *performance* dos testes confirmatórios séricos, pois foram realizados segundo o protocolo publicado no Diário Oficial do Estado de São Paulo (59), que inclui as dosagens séricas da 17OHP, cortisol, androstenediona, testosterona, além das dosagens de sódio e potássio. Nesta casuística, a dosagem dos esteroides séricos foi realizada através da metodologia espectrometria de massa e os dados foram incluídos para se ratificar o diagnóstico de RN afetado pela forma clássica ou de um RFP. Conforme esperado (9), os Rns afetados pelas formas clássicas possuíam valores séricos da 17OHP muito elevados, geralmente acima do que 100

ng/mL na forma perdedora de sal; valores pouco aumentados (< 50 ng/mL) foram observados no diagnóstico precoce de Rns com a forma virilizante simples.

Semelhantemente, os testes moleculares foram realizados para avaliação diagnóstica de Rn com teste confirmatório sérico elevado. Todos os Rns com diagnóstico hormonal de forma clássica tiveram genótipo compatível, mutações com grave comprometimento da atividade enzimática em ambos os alelos, ratificando o diagnóstico hormonal. Embora as análises de sódio e potássio desta casuística já estavam alteradas na maioria dos Rns com a forma perdedora de sal, o estudo molecular também oferece a vantagem de realizar o diagnóstico diferencial entre as formas perdedora de sal e virilizante simples, o que possui implicações terapêuticas (9). Porém, dentre os 49 Rns afetados, tivemos acesso à coleta das amostras de DNA de apenas 14 casos, uma vez que estes Rns estavam em seguimento em diferentes serviços terciários de nosso Estado e até mesmo em serviços privados.

Consideramos que o maior auxílio do estudo molecular seja na análise de Rns com valores pouco aumentados da 17OHP sérica, especialmente no sexo masculino, onde se torna necessário se realizar o diagnóstico diferencial entre forma VS, forma NC e RFP. O número de casos com resultados indeterminados nesse estudo foi pequeno devido ao início recente da triagem da HAC-21OH em nosso Estado. A análise molecular foi útil no diagnóstico de forma NC em dois casos, um de sexo masculino e outro feminino, e permitiu a alta do seguimento de outros quatro casos assintomáticos com valores persistentemente alterados da 17OHP sérica. Em estudo anterior, em casuística de triagem neonatal do Estado de Goiás, pudemos verificar a utilidade do estudo molecular como teste confirmatório da triagem neonatal (19). Estima-se que o custo da análise molecular seja de aproximadamente oitenta euros (56), porém, novamente, é necessário se levar em conta o custo do seguimento de longo prazo dos casos assintomáticos com testes séricos persistentemente alterados, que podem em algumas situações ultrapassar mais do que seis meses (19).

Com os dados expostos, concluímos que na triagem neonatal da HAC-21OH em nosso meio, a 17OHP deva ser ajustada em quatro grupos de peso

ao nascimento e também quanto à idade da coleta da amostra neonatal. Sugerimos que a padronização dos valores de corte da N17OHP seja de acordo como percentil 99,8. Esta estratificação reduz o número de resultados falso-positivos, sem a perda de diagnóstico dos verdadeiramente afetados, além de melhorar o valor preditivo positivo de um teste alterado.

6. CONCLUSÕES

Através da análise retrospectiva dos dados de 271.810 recém-nascidos triados, concluímos que:

- Os valores da N17OHP diferem significativamente entre as coletas realizadas no terceiro dia de vida e após, em todos os grupos de peso;
- Devem ser adotados para o nosso PNTN diferentes valores de corte para a N17OHP em coletas realizadas no terceiro dia de vida e a partir do quarto dia;
- Os valores de corte da N17OHP para o percentil 99,8, de acordo com o tempo de vida na coleta e peso ao nascimento, são ideais para o nosso programa por reduzirem significativamente a taxa de resultados falso-positivos.
- Os valores de corte da N17OHP para o percentil 99,8, de acordo com o tempo de vida na coleta e peso ao nascimento, aumentam a especificidade e o VPP em relação ao percentil 99,5 (atualmente utilizado pelo programa), sem a perda do diagnóstico da forma perdedora de sal.

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O documento contém informações sobre o estudo que você está sendo convidado a participar de livre e espontânea vontade, você deverá ler e compreender todo o conteúdo e realizar perguntas sobre tudo que não tiver entendido, A equipe de estudo estará à disposição para responder às suas perguntas em qualquer momento, ou seja, antes, durante e após o estudo,

1 – Título do projeto:

“Otimização dos valores de Referência da 17OH-Progesterona neonatal de acordo com o peso ao nascimento no Programa de Triagem Neonatal da APAE DE SÃO PAULO ”,

2 – Objetivo do estudo:

A Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase (HAC-21OH) é uma doença hereditária que afeta a produção de um de nossos hormônios essenciais a vida, o cortisol e aumento da secreção de andrógenos, Ela pode se apresentar formas clínicas com diferentes gravidades: Forma Clássica Perdedora de Sal e a Forma Clássica Virilizante Simples,

Na Forma Clássica, forma mais grave, o sexo feminino apresenta virilização pré- natal da genitália externa, o que pode levar a erros de registro de sexo civil ao nascimento enquanto o sexo masculino a genitália apresenta-se normal, não sendo possível seu diagnóstico ainda no período neonatal, Setenta por cento dos casos de forma clássica também apresentam perda de sal no período neonatal, a qual sem tratamento pode evoluir para choque e óbito,

Nosso objetivo é definir a incidência das diferentes formas clínicas da HAC-21OH, mostrar que estas características tornam a Hiperplasia Adrenal Congênita uma doença de eleição para inclusão em programas públicos de triagem neonatal, pois possui uma frequência relativamente alta, não é facilmente detectada por meios clínicos, pode ser diagnosticadas por um simples teste de triagem neonatal, o teste do pezinho, procedimento simples, tratamento disponível e o diagnóstico e tratamento precoces promovem

significativa redução das mortes no período neonatal e o aumento na proporção de diagnóstico do sexo masculino em relação feminino,

3 – Descrição dos desconfortos e riscos:

Após a segunda coleta com resultado alterado na triagem neonatal (papel filtro), a família será encaminhada a etapa referente aos exames confirmatórios que será realizado em parceria com profissionais especializados do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 – Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP,

A coleta será realizada em veia periférica (em geral no antebraço), por profissional treinado e habilitado para realizar o procedimento com material estéril e descartável, não havendo necessidade de hospitalização ou do jejum, Durante a coleta, poderão ocorrer hematomas no local da punção,

Uma entrevista mais aprofundada será realizada a respeito dos antecedentes médicos do bebê e da família em conjunto com a permissão de que o bebê seja examinado pelo profissional médico,

4 – Benefícios:

Não há benefício direto ao participante, tal como remuneração com a participação do paciente e de sua família no estudo e nem despesas adicionais à família,

O paciente terá acompanhamento e assistência da equipe interdisciplinar, todas as informações médicas decorrentes da pesquisa farão parte do prontuário do paciente e serão submetidos aos regulamentos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP quanto ao sigilo da informação médica,

Procedimentos alternativos poderão ser solicitados, caso seja pertinente, tais como Pesquisa por Biologia Molecular,

5 – Garantia de acesso:

Em toda e qualquer etapa do estudo, você poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, O principal investigador é a Farmacêutica Bioquímica Giselle Yuri Hayashi,

registrada no Conselho Regional de Farmácia de São Paulo sob o número CRF 8-15.038 e pode ser encontrada no Laboratório do Serviço de Referência em Triagem Neonatal da APAE DE SÃO PAULO, situada na Rua Loefgreen, 2.109 – Vila Clementino, São Paulo, Capital, Telefone para contato (11) 5080-7021 e no endereço eletrônico: gisellelleyuri@apaesp.org.br

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), situada na Avenida Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255, telefone: (11) 2661-7512 e endereço eletrônico: www.hc.fm.usp.br

6 – É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo (sem qualquer prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento na Instituição - quando essa situação for pertinente),

7 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, preservando a confidencialidade dos participantes da pesquisa,

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores,

9 – Compromissos do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa,

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Otimização dos valores de Referência da 17OH-Progesterona neonatal de acordo com o peso ao nascimento no Programa de Triagem Neonatal da APAE DE SÃO PAULO”,

Eu discuti com a Giselle Yuri Hayashi e/ou com a equipe profissional responsável pela pesquisa sobre minha decisão em participar deste estudo, Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos

a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes,

Ficou claro também que tenho a garantia do acesso ao tratamento hospitalar quando necessário,

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço,

Assinatura do sujeito de pesquisa/representante legal

data

Assinatura da testemunha (*)

data

(*) Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual,

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo,

Giselle Yuri Hayashi

Data

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mello MP, Bachega TASS, Santos MC. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46(4):457-77.
2. New MI, Dupont B, Grumbach K, Levine LS. Congenital Adrenal Hyperplasia and related conditions. The Metabolic Bases of Inherited Disease. New York: McGraw Hill; 1982. p. 973-1000.
3. New MI, Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia. Clinical Pediatric Endocrinology. Oxford 1989. p. 441.
4. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. Endocrinol Metab Clin North Am 2009 Dec;38(4):699-718.
5. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2010 Sep;95(9):4133-60.
6. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med 2003 Aug 21;349(8):776-88.
7. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. Lancet 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36.
8. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics 1988 Jun;81(6):866-74.
9. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1998 Dec;83(12):4416-9.
10. Torres N, Mello MP, Germano CM, Elias LL, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the

CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res* 2003 Oct;36(10):1311-8.

11. Alves CAD. Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita: Considerações sobre elevações transitórias da 17 Hidroxiprogesterona. *RBPS* 2006;19(14):203-8.

12. Grosse SD, Van Vliet G. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia? *Horm Res* 2007;67(6):284-91.

13. Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, et al. Weight-adjusted neonatal 17OH-progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011 Nov;55(8):632-7.

14. Prader A. Hereditary defects of adrenal cortical steroid biosynthesis. *Prog Clin Biol Res* 1985;200:219-31.

15. Votava F, Torok D, Kovacs J, Moslinger D, Baumgartner-Parzer SM, Solyom J, et al. Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005 Jun;152(6):869-74.

16. Steigert M, Schoenle EJ, Biason-Lauber A, Torresani T. High reliability of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Switzerland. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Sep;87(9):4106-10.

17. New MI. An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2004 Dec;1038:14-43.

18. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000 Jun;21(3):245-91.

19. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet* 2009 Dec;76(6):503-10.

20. Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab* 1982 Sep;55(3):413-20.
21. Santos MC, Silveira E, Dos Santos EP, Gomes L, Madureira G, Brito V, et al., editors. Comparison of clinical features between CAH cohorts from Goiás and São Paulo: states with and without neonatal screening. VIII Congreso Latinoamericano de Errores Innatos Del Metabolismo y Pesquisa Neonatal; 2011; Cuzco, Peru.
22. Silveira EL, dos Santos EP, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Elnecave RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred--an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008 May;21(5):455-60.
23. Pang S, Clark A. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hidroxilase deficiency: newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *J Med Screen* 1993(2):105-39.
24. Bachega TASS, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Mello MP, et al. Estudo Multicêntrico de pacientes brasileiros com deficiência de 21-hidroxilase: correlação genótipo fenótipo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48(5):696-704.
25. White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 2009 Sep;5(9):490-8.
26. Wallace AM, Beesley J, Thomson M, Giles CA, Ross AM, Taylor NF. Adrenal status during the first month of life in mature and premature human infants. *J Endocrinol* 1987 Mar;112(3):473-80.
27. Grumbach MM, Shaw EB. Further studies on the treatment of congenital adrenal hyperplasia with cortisone: IV. Effect of cortisone and compound B in infants with disturbed electrolyte metabolism, by John F. Crigler Jr, MD, Samuel H. Silverman, MD, and Lawson Wilkins, MD, *Pediatrics*, 1952;10:397-413. *Pediatrics* 1998 Jul;102(1 Pt 2):215-21.

28. van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004 Nov;151 Suppl 3:U71-5.
29. Therrell BL, Jr., Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998 Apr;101(4 Pt 1):583-90.
30. Hingre RV, Gross SJ, Hingre KS, Mayes DM, Richman RA. Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Feb;78(2):266-70.
31. Thompson R, Seargeant L, Winter JS. Screening for congenital adrenal hyperplasia: distribution of 17 alpha-hydroxyprogesterone concentrations in neonatal blood spot specimens. *J Pediatr* 1989 Mar;114(3):400-4.
32. Votava F, Novotna D, Kracmar P, Vinohradska H, Stahlova-Hrabincova E, Vrzalova Z, et al. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. *Eur J Pediatr* 2012 Jun;171(6):935-40.
33. Janzen N, Sander S, Terhardt M, Steuerwald U, Peter M, Das AM, et al. Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2011 Dec 11;76(13):1437-42.
34. Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessig R, Maby S, Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr* 1997 Jan;130(1):128-33.
35. Lee JE, Moon Y, Lee MH, Jun YH, Oh KI, Choi JW. Corrected 17-alpha-hydroxyprogesterone values adjusted by a scoring system for screening congenital adrenal hyperplasia in premature infants. *Ann Clin Lab Sci* 2008 Summer;38(3):235-40.
36. Nordenstrom A, Thilen A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital

adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1999 May;84(5):1505-9.

37. van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, van Baarle M, Otten BJ, Wit JM, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. J Clin Endocrinol Metab 2005 Jul;90(7):3904-7.

38. Pezzuti IL, Silva IN, Barra CB, Mantovani RM, Januário JN, editors. Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita - Projeto-piloto realizado pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais, Brasil (PETN - MG). VIII Congreso Latinoamericano de Errores Innatos Del Metabolismo y Pesquisa Neonatal; 2011; Cuzco, Peru.

39. Cardoso CB, Fonseca AA, Oliveira Mde F, Pereira BB, Guimaraes MM. [Congenital adrenal hyperplasia newborn screening: Rio de Janeiro experience]. Arq Bras Endocrinol Metabol 2005 Feb;49(1):112-9.

40. Torresani T, Gruters A, Scherz R, Burckhardt JJ, Harras AMZ, Zachmann M. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17 hydroxyprogesterone to gestacional age. Screening 1994(3):77-84.

41. www.presidencia.gov.br/ccivil/leis/L8069.htm.

42. <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/portarias/port2004/Gm/GM-2695.htm>.

43. Gidlof S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenstrom A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. JAMA Pediatr 2014 Jun;168(6):567-74.

44. Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, Derraik JG, Jefferies C, Carll J, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013. J Clin Endocrinol Metab 2015 Mar;100(3):1002-8.

45. Morikawa S, Nakamura A, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Miyata J, et al. Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in sapporo. Clin Pediatr Endocrinol 2014 Apr;23(2):35-43.

46. Dorr HG, Odenwald B, Nennstiel-Ratzel U. Early of children with classic congenital hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency by newborn screening. *Int J Neonatal Screen* 2015;1(1):36-44.
47. Gruneiro de Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bergada C. Congenital adrenal hyperplasia and early newborn screening: 17 alpha-hydroxyprogesterone (17 alpha-OHP) during the first days of life. *J Med Screen* 1998;5(1):24-6.
48. Rauh M, Groschl M, Rascher W, Dorr HG. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 2006 Jun;71(6):450-8.
49. Rossi C, Calton L, Hammond G, Brown HA, Wallace AM, Sacchetta P, et al. Serum steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010 Feb;411(3-4):222-8.
50. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007 Oct;115(9):559-70.
51. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem* 2008 Jun;41(9):649-62.
52. Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2007 Jun 28;44(2):342-55.
53. De Jesus VR, Simms DA, Schiffer J, Kennedy M, Mei JV, Hannon WH. Pilot proficiency testing study for second tier congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Chim Acta* 2010 Nov 11;411(21-22):1684-7.
54. Dhillon K, Ho T, Rich P, Xu D, Lorey F, She J, et al. An automated method on analysis of blood steroids using liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to population screening for congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Clin Chim Acta* 2011 Nov 20;412(23-24):2076-84.

55. Schwarz E, Liu A, Randall H, Haslip C, Keune F, Murray M, et al. Use of steroid profiling by UPLC-MS/MS as a second tier test in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the Utah experience. *Pediatr Res* 2009 Aug;66(2):230-5.
56. Malikova J, Votava F, Vrzalova Z, Lebl J, Cinek O. Genetic analysis of the CYP21A2 gene in neonatal dried blood spots from children with transiently elevated 17-hydroxyprogesterone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012 Aug;77(2):187-94.
57. NCCLS - Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. National Committee for clinical Laboratory Standards 2004.
58. Cardoso CBMA. Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita. In: Blog Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia 2006.
59. Resolução SS - 122, de 21/11/2013. Diário Oficial - Poder Executivo 2013.
60. Prader A. [Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms]. *Helv Paediatr Acta* 1954 Jul;9(3):231-48.
61. Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Sep;87(9):4314-7.
62. Al-Nuaim AR, Abdullah MA, Stevens B, Zain M. Effect of gender, birth weight and gestational age on serum 17-hydroxyprogesterone concentration and distribution among neonates in Saudi Arabia. *Indian J Pediatr* 1995 Sep-Oct;62(5):605-9.
63. Balsamo A, Cacciari E, Piazzzi S, Cassio A, Bozza D, Pirazzoli P, et al. Congenital adrenal hyperplasia: neonatal mass screening compared with clinical diagnosis only in the Emilia-Romagna region of Italy, 1980-1995. *Pediatrics* 1996 Sep;98(3 Pt 1):362-7.

64. Lebovitz RM, Pauli RM, Laxova R. Delayed diagnosis in congenital adrenal hyperplasia. Need for newborn screening. Am J Dis Child 1984 Jun;138(6):571-3.
65. Suwa S. Nationwide survey of neonatal mass-screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan. Screening 1994(3):141-51.
66. White PC. Optimizing newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr 2013 Jul;163(1):10-2.
67. www.prefeiturasp.gov.br/cidade/secretarias/saude/programas/index.php.
68. Nascimento ML, Cristiano AN, Campos T, Ohira M, Cechinel E, Simoni G, et al. Ten-year evaluation of a Neonatal Screening Program for congenital adrenal hyperplasia. Arq Bras Endocrinol Metabol 2014 Oct;58(7):765-71.
69. Cavarzere P, Samara-Boustani D, Flechtner I, Dechaux M, Elie C, Tardy V, et al. Transient hyper-17-hydroxyprogesteronemia: a clinical subgroup of patients diagnosed at neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol 2009 Aug;161(2):285-92.
70. Nordenstrom A, Wedell A, Hagenfeldt L, Marcus C, Larsson A. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: 17-hydroxyprogesterone levels and CYP21 genotypes in preterm infants. Pediatrics 2001 Oct;108(4):E68.
71. Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergada C. Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. Horm Res 2001;55(6):271-7.
72. Olgemoller B, Roscher AA, Liebl B, Fingerhut R. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. J Clin Endocrinol Metab 2003 Dec;88(12):5790-4.
73. www.saude.sp.gov.br.
74. White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. Semin Reprod Med 2012 Oct;30(5):400-9.

75. Brosnan CA, Brosnan P, Therrell BL, Slater CH, Swint JM, Annegers JF, et al. A comparative cost analysis of newborn screening for classic congenital adrenal hyperplasia in Texas. *Public Health Rep* 1998 Mar-Apr;113(2):170-8.
76. Autti-Ramo I, Makela M, Sintonen H, Koskinen H, Laajalahti L, Halila R, et al. Expanding screening for rare metabolic disease in the newborn: an analysis of costs, effect and ethical consequences for decision-making in Finland. *Acta Paediatr* 2005 Aug;94(8):1126-36.
77. Virdi NK, Rayner PH, Rudd BT, Green A. Should we screen for congenital adrenal hyperplasia? A review of 117 cases. *Arch Dis Child* 1987 Jul;62(7):659-62.
78. Tajima T, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Mitsuhashi Y. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan. *Pediatr Endocrinol Rev* 2012 Oct;10 Suppl 1:72-8.
79. Minutti CZ, Lacey JM, Magera MJ, Hahn SH, McCann M, Schulze A, et al. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Aug;89(8):3687-93.
80. Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010 Aug;121(3-5):491-5.