

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**O PAPEL DA ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CYP21*  
NOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL PARA  
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

**TATIANA DE OLIVEIRA RASSI**

**Belo Horizonte**

**2011**

**TATIANA DE OLIVEIRA RASSI**

**O PAPEL DA ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CYP21*  
NOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL PARA  
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Rafael Machado Mantovani

**Belo Horizonte**

**2011**



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Bulena 190 - sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[www.medicina.ufmg.br](http://www.medicina.ufmg.br)



ATA DA DEFESA DE MONOGRAFIA de **TATIANA DE OLIVEIRA RASSI** nº de registro 2010666180. No dia **oito de novembro de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora indicada pela Coordenação do Curso de Especialização em Endocrinologia Pediátrica, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“O PAPEL DA ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CYP21 NOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA CONGENITA DA SUPRA RENAL”**, requisito final para a obtenção do Grau de Especialista em Endocrinologia Pediátrica, pelo Curso de Especialização em Endocrinologia Pediátrica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof.º Rafael Machado Mantovani, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof.º Rafael Machado Mantovani/Orientador

Instituição: UFMG

Indicação: Aprovado

Prof.ª Ivani Novato Silva

Instituição: UFMG

Indicação: Aprovada

Prof.ª Vera Maria Alves Dias

Instituição: UFMG

Indicação: Aprovada

Pelas indicações a candidata foi considerada \_\_\_\_\_  
recebendo a nota final de 100 pontos.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora, Belo Horizonte, 08 de novembro de 2011.

Prof. Rafael Machado Mantovani/ Orientador \_\_\_\_\_

Prof.ª Ivani Novato Silva \_\_\_\_\_


Prof.ª Vera Maria Alves Dias \_\_\_\_\_

Prof.ª Ivani Novato Silva/ Coordenadora \_\_\_\_\_

Prof.ª Ivani Novato Silva  
Coordenadora do Curso de Especialização  
em Endocrinologia Pediátrica  
Faculdade de Medicina - UFMG

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

*Em tempo o rd se registou 2010 666180  
Leia-se 2011672125*

  
CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Ivani por seu inestimável papel na minha formação como Endocrinologista e por toda dedicação, carinho e paciência destinados a mim durante este período.

Ao meu orientador Rafael pela amizade e por todos os ensinamentos imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

À Equipe da Divisão de Endocrinologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial ao Dr. Chagas por me servir de inspiração e exemplo na prática diária da Medicina.

Aos queridos colegas da Especialização: Augusto, Cristina, Lara, Enda, Christiany, Gracielle, Juliana e Patrícia por todos os bons momentos compartilhados dentro e fora do Hospital das Clínicas.

À equipe do NUPAD/FM/UFMG, em especial à Rita sem a qual este trabalho jamais seria possível.

À Isabela pelo auxílio e pelas informações por ela prestadas.

Ao meu marido Rodrigo pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos.

Aos meus pais Nelson e Márcia pelo exemplo de perseverança e amor à ciência na qual eu almejo me espelhar. Agradeço também por todo amor que vocês me dedicam.

## RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma doença que preenche os critérios para sua inclusão em programas de triagem neonatal (PTN), por ser relativamente frequente na população, potencialmente fatal e que pode ser triada por simples dosagem hormonal. A principal dificuldade encontrada pelos PTN para HAC é o alto número de falsos positivos detectados em decorrência principalmente da baixa especificidade do método e da hiper-17-hidroxiprogesteronemia transitória encontrada em recém nascidos prematuros.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da análise molecular do gene *CYP21* como exame de segunda etapa na triagem neonatal para HAC.

A análise molecular do *CYP21* já é utilizado como exame auxiliar nos PTN de diversos países. Sua principal utilização é na distinção precoce das formas graves perdedoras de sal, que necessitam de intervenção terapêutica imediata, das demais formas da doença (virilizante simples ou não clássica). A análise molecular também mostra-se útil na definição de casos duvidosos. Em relação ao tratamento da HAC, a genotipagem pode ser vantajosa tanto em evitar o atraso do início da reposição hormonal em meninos com a forma virilizante simples, como em evitar a indicação de corticóide em pacientes saudáveis. A precocidade da definição diagnóstica também é benéfica para as famílias de recém nascidos falso positivos, pois reduz o tempo de estresse e ansiedade a que são submetidos.

Como exame de segunda etapa na triagem neonatal para HAC, a análise molecular é um exame definitivo e de fundamental importância tanto na definição de casos duvidosos quanto na exclusão de recém nascidos que não possuem a doença. Estudos demonstraram um vantajoso custo-benefício em sua inclusão nos PTN para HAC.

Palavras-chave: Triagem neonatal. Hiperplasia adrenal congênita. 17-hidroxiprogesteronemia.

## ABSTRACT

### **Molecular analysis of *CYP21* in neonatal screening programs.**

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is suitable for newborn screening, as it is a common and potentially fatal disease which can be easily screened by a simple hormonal measurement. The main difficulty found by Neonatal Screening Programs (NSP) for CAH is the high incidence of false-positive results due to a low specificity of the test and a transitory hyper-17-hydroxyprogesteronemia usually found in preterm newborns

The objective of this study was to evaluate the role of molecular analysis of the *CYP21* gene as a second tier test in neonatal screening for CAH.

Molecular analysis of *CYP21* is already used as an adjunct test in many NSP around the world. It is mainly used for the distinction of severe salt wasting forms from the other forms of the disease (simple virilizing or non-classic). Molecular analysis was also shown to be useful in diagnosing indefinite cases. When it comes to treatment of CAH, genotyping is able to avoid the delay of hormonal reposition in boys with the simple virilising form and also can avoid an inadequate treatment for healthy patients. Early diagnosis also benefits the families of healthy false-positive newborns, reducing the time of stress and anxiety to which they are submitted.

As a second tier exam in neonatal screening for CAH, molecular analysis is a definitive exam with great importance not only in clarifying indefinite cases, but also in excluding healthy newborns who were considered sick. Studies have shown a good cost-benefit in adopting this exam in NSP for CAH.

Key words: Neonatal screening. Congenital adrenal hyperplasia. 17-hydroxyprogesteronemia.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17-OHP	17-hidroxiprogesterona
ACTH	Corticotrofina
CL	Cromatografia líquida
CL-EMEM	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em <i>tandem</i>
D21-OH	Deficiência da 21-hidroxilase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EM	Espectrometria de massa
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
IG	Idade gestacional
PTN	Programa de Triagem Neonatal
VPP	Valor preditivo positivo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

FIGURA 1 Correlação fenótipo-genótipo na Deficiência da 21-hidroxilase. 12



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Critérios de Wilson e Jugner para inclusão de doenças em programas de triagem.....	14
TABELA 2 Estudos que utilizaram a análise molecular do gene CYP21 em Programas de Triagem Neonatal para Hiperplasia Adrenal Congênita.....	18

## SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO.....	11
3 O GENE <i>CYP21</i> .....	12
4 TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA.....	14
5 FALSO- POSITIVOS.....	16
6 A ANÁLISE MOLECULAR DO GENE <i>CYP21</i> .....	18
7 CONCLUSÕES.....	21
8 REFERÊNCIAS.....	22

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas da Língua Portuguesa.

## 1 INTRODUÇÃO

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) consiste em um grupo de doenças de herança autossômica recessiva, consequência da deficiência de uma das cinco enzimas responsáveis pela síntese do cortisol<sup>1</sup>.

A forma mais comum de HAC ocorre pela deficiência da enzima 21-hidroxilase (21-OH), um citocromo P450, responsável pela conversão da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-deoxicortisol e da progesterona em deoxicorticosterona, precursores do cortisol e da aldosterona, respectivamente.

Dependendo do grau de inatividade da enzima 21-OH, ocorre um bloqueio da síntese de cortisol, levando a um aumento da produção de ACTH pela glândula hipófise. Esse estímulo do ACTH leva a uma hiperplasia das glândulas adrenais e à formação de mais precursores do cortisol e aldosterona que, devido ao bloqueio enzimático, serão desviados para a conversão de esteróides sexuais.

A HAC manifesta-se como consequência desta exposição prolongada aos esteróides sexuais, principalmente a testosterona. Nas formas clássicas, haverá virilização nas crianças do sexo feminino e uma aceleração de crescimento e fechamento precoce de epífises em ambos os sexos. Em 75% dos casos de HAC clássica há uma deficiência concomitante de aldosterona que pode manifestar-se com uma desidratação grave.

Nas formas não clássicas, os sinais de hiperandrogenismo manifestam-se mais tardiamente e de forma variada, podendo ser inclusive assintomáticas<sup>2</sup>.

A deficiência da 21-OH tem uma incidência que varia de 1:10.000 a 1:20.000 em diferentes populações. Em diversos países, inclusive em alguns estados brasileiros foi incluída em programas de triagem neonatal (PTN)<sup>3-5</sup>.

A triagem neonatal para HAC já demonstrou ser efetiva na redução da morbimortalidade de suas formas mais graves. No entanto, devido à baixa especificidade dos métodos de detecção da HAC utilizados atualmente, o número de falsos positivos triados é grande, o que onera os PTN<sup>6</sup>.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste artigo será revisar o papel da análise molecular do gene *CYP21*, responsável pela codificação da 21-OH, na triagem neonatal para HAC.

### 3 O GENE *CYP21*

O gene *CYP21* é responsável pela codificação da enzima 21-OH e em seres humanos está localizado no complexo de histocompatibilidade HLA do braço curto do cromossomo 6. Neste mesmo local também se encontra um pseudogene inativo, o *CYP21P*, que contém 98% de concordância na sequência de nucleotídeos com o *CYP21*.

A maioria das mutações causadoras de deficiência de 21-OH descritas até o momento é resultado de dois tipos de recombinação entre o *CYP21* e *CYP21P*. Setenta e cinco por cento delas ocorrem pela transferência de sequências deletérias do *CYP21P* para o *CYP21* durante a mitose, processo chamado de conversão gênica. Vinte por cento resulta da deleção de um segmento gênico de 30-kb que inclui parte do *CYP21* durante o processo de meiose.

Até o momento mais de 100 mutações causadoras de HAC foram descritas. Entretanto, nove mutações aparecem com maior frequência em diversas populações (I2 splice, I172N, V281L, R356W, Q318X, P30L, Del 8bp, Cluster exon 6, insT). As mutações do gene *CYP21* podem ser agrupadas de acordo com sua correlação com as diferentes formas clínicas da HAC. (FIG. 1) Esta correlação fenótipo-genótipo decorre do diferente grau de deficiência enzimática que cada mutação pode causar.

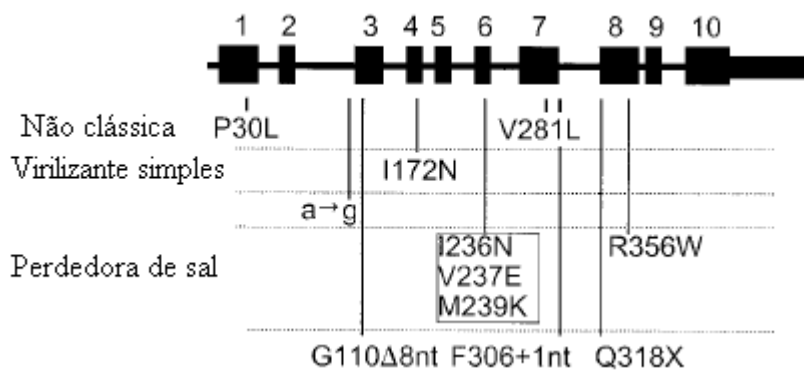


FIGURA 1 – Localização no gene *CYP21* das nove mutações de ponto mais frequentes na deficiência da 21-hidroxilase.

Mutações que levam à inatividade enzimática total resultam na manifestação da forma perdedora de sal. Já mutações que permitem uma produção enzimática de 21-OH de até 2% manifestam a forma virilizante simples. A forma não clássica da HAC decorre de mutações que levam a uma atividade enzimática em torno de 40 a 60%.

Apesar da boa correlação do genótipo com o fenótipo a análise molecular para predição da forma clínica da HAC deve ser utilizada com cautela. Isso pelo fato de a maioria dos portadores de HAC serem heterozigotos compostos com diferentes mutações em seus alelos. Uma estratégia que demonstrou eficácia relativa é levar em conta que, como a HAC é uma doença de herança recessiva, o fenótipo manifestado pelo paciente será reflexo do alelo que possui a mutação mais leve<sup>2</sup>.

## 4 TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA

Em 1968 Wilson e Jungner publicaram em seu artigo “*Principles of Early Disease Detection*” um conjunto de critérios que até os dias de hoje, é o mais utilizado para a inclusão de doenças em programas de triagem<sup>7</sup> (TAB. 1). O primeiro PTN foi instituído em 1963 para a detecção precoce da fenilcetonúria e, desde então, diversas outras condições foram incluídas nesse tipo de programa.

TABELA 1

Crítérios clássicos de Wilson e Jungner para triagem

- A condição investigada deve ser um importante problema de saúde.
- Deverá existir um tratamento aceitável para os pacientes com a doença diagnosticada.
- Meios para o diagnóstico e tratamento devem estar disponíveis.
- A doença deverá ter um período latente ou um estágio de sintomas iniciais.
- Deverá existir um teste ou exame adequado.
- O teste deverá ser aceito pela população.
- A história natural da doença, incluindo o desenvolvimento do estado latente para a doença manifesta, deverá ser bem compreendida.
- Deverá haver um consenso sobre quais pacientes deverão ser tratados.
- O custo da busca do caso (incluindo diagnóstico e tratamento daqueles diagnosticados) deverá ser economicamente balanceado em relação ao gasto com a doença com um todo.
- A busca do caso deverá ser um processo contínuo e não um projeto pontual.

A HAC é uma doença com incidência semelhante à fenilcetonúria e elevada morbimortalidade se não for detectada a tempo. Crianças com as formas clássicas perdedoras de sal, principalmente meninos e meninas altamente virilizadas, estão sujeitas a serem diagnosticadas apenas sob a vigência de uma crise adrenal, quadro grave de choque hipovolêmico com alto índice de mortalidade. Meninas muito virilizadas também correm o risco de serem equivocadamente registradas com o sexo masculino trazendo sérios prejuízos sociais e psicológicos futuros.

O diagnóstico neonatal da HAC evita o registro equivocado de meninas e permite a reposição hormonal precoce nesses pacientes reduzindo o índice de mortalidade da crise adrenal<sup>8,9</sup>.

Desde 1977, quando Pang e colaboradores, desenvolveram um método de detecção da 17-OHP por meio de sangue coletado em papel filtro, a HAC vem sendo incluída em PTNs em diversos países<sup>10, 11</sup>. No Brasil é realizada por meio dos Programas Estaduais de Triagem Neonatal apenas nos estados de Goiás e Santa Catarina<sup>4,12</sup>.



## 5 FALSOS POSITIVOS

A principal dificuldade encontrada nos PTN para HAC é o grande número de falsos positivos detectados. A média de reconvocações dos programas varia entre 1 a 3%<sup>13,14</sup> devido a diversos fatores.

Primeiramente, os valores de pontos de corte não podem ser universalmente estabelecidos devido à maneira diversa com que a HAC se manifesta em diferentes populações. Outro fator é a ausência de padronização da metodologia da triagem, o que leva os programas a usarem: diferentes ensaios, anticorpos e reagentes; papel filtro de espessura e densidade variáveis e diferentes datas de coleta<sup>15</sup>.

Reações cruzadas com monossulfatos esteróides e ácidos glucoriônicos também são responsáveis por níveis irreais de 17-OHP nos imunoenaios<sup>16</sup>.

Condições clínicas dos recém nascidos afetam os níveis de 17-OHP. Doenças graves e desidratação podem levar a uma 17-hidroxiprogesteronemia transitória devido ao estímulo da produção de ACTH secundário ao estresse.

Uma população em particular que costuma apresentar níveis mais altos de 17-OHP é a dos recém nascidos pré-termos e baixo peso (peso ao nascer <2500g). Em um estudo sueco<sup>17</sup>, dentre as crianças falso-positivas triadas para HAC, 43% eram prematuras, apesar de o número de prematuros compor apenas 6% do total de recém nascidos. Este fato é atribuído à imaturidade adrenal dos prematuros e às situações de estresse que geralmente enfrentam ao nascer.

A fim de se obter uma sensibilidade adequada, os PTN para HAC em geral estabelecem um ponto de corte que considera cerca de 1% de todos os testes realizados como positivos. Como a HAC é uma doença rara, considerando-se uma incidência de 1:10.000, apenas uma em cada 100 crianças triadas positivas, realmente terá a doença<sup>6</sup>.

Tal fato onera os PTN devido à necessidade de um seguimento clínico destes pacientes falso-positivos, até que o valor de 17-OHP se normalize. Esses custos poderiam ser reduzidos com uma melhora da especificidade do método de triagem.

Diversas estratégias já foram propostas. Muitos programas adotaram o ponto de corte da 17-OHP ajustado para idade gestacional e peso ao nascer<sup>13-14,18</sup> conseguindo-se reduzir o número de reconvocações e aumentar o valor preditivo positivo do teste sem reduzir sua sensibilidade. A técnica de extração com éter também se mostrou eficaz em

reduzir a reação cruzada com outros metabólitos<sup>19</sup>. No entanto, apesar destes esforços, a taxa de reconvocação nos programas de triagem neonatal para HAC continua alta<sup>17</sup>.

A utilização de testes mais específicos em uma segunda etapa da triagem é uma proposta que vem sendo discutida nos últimos anos nos PTN. Por ser um exame definitivo na detecção da deficiência de 21-OH, a realização da análise molecular do gene *CYP21* nas crianças com exames de 17OHP positivos é uma estratégia proposta por alguns autores no auxílio diagnóstico dos PTN para HAC<sup>6, 21</sup>.

## 6 A ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CYP21*

A genotipagem de crianças triadas vem sendo utilizada como complemento diagnóstico nos PTN de alguns países<sup>5, 20-28</sup> (TAB.2). O objetivo desse exame seria tanto definir previamente o grau de gravidade da HAC quanto discriminar os pacientes falso-positivos daqueles verdadeiramente doentes.

TABELA 2

Estudos que realizaram a análise molecular do *CYP21* em crianças triadas por programas de triagem neonatal para HAC

Estudo	N	HAC	Heterozigose	Sem mutações
Witchel <i>et al.</i> , 1996 <sup>22</sup>	15	12	-	3
Tajima <i>et al.</i> , 1997 <sup>25</sup>	4	1	3	-
Fitness <i>et al.</i> , 1999 <sup>24</sup>	21	10	-	11
Nordestrom <i>et al.</i> , 1999 <sup>20</sup>	114	91	-	13
Yang <i>et al.</i> , 2001 <sup>26</sup>	30	30	-	-
Kosel <i>et al.</i> , 2005 <sup>23</sup>	159	59	-	100
Cavarzere <i>et al.</i> , 2009 <sup>27</sup>	23	8	-	15
Silveira <i>et al.</i> , 2009 <sup>4</sup>	42	28	5	9
Pezzuti <i>et al.</i> , 2010 <sup>5</sup>	59	8	17	34
Fernandes <i>et al.</i> , 2011 <sup>28</sup>	66	31	1	34

N= número de crianças testadas HAC= hiperplasia adrenal congênita

A definição do diagnóstico de HAC pode ser muito complexa, principalmente se a criança não manifestar os sinais clínicos da doença em um primeiro momento. Meninos com a forma virilizante simples podem ser assintomáticos no período neonatal ou apresentarem uma genitomegalia que passa despercebida no exame físico. Em meninos outro desafio diagnóstico é diferenciar os portadores da forma virilizante simples daqueles com a forma não clássica. O uso da correlação genótipo-fenótipo de acordo com a mutação encontrada na análise molecular é uma ferramenta de grande auxílio na elucidação destes casos.

O atraso do início do tratamento em crianças portadoras de HAC, que pode trazer malefícios irreversíveis ao paciente, é um fator que poderia ser evitado com a genotipagem precoce. Em um estudo de crianças triadas pelo PTN do estado de Goiás e que estavam em acompanhamento clínico devido a níveis elevados de 17-OHP, Silveira e colaboradores, diagnosticaram três meninos com HAC na forma clássica virilizante simples que não estavam sendo tratados<sup>21</sup>.

Outro ponto que merece atenção em relação ao tratamento é a indicação do uso de glicocorticóide em crianças saudáveis que pode ocorrer nos casos duvidosos. Em um estudo americano<sup>22</sup> a análise molecular do *CYP21* descartou a necessidade de reposição hormonal em três crianças que apresentavam níveis elevados de 17OHP. Em outro exemplo um estudo em Goiás identificou uma criança heterozigota que estava em uso de glicocorticóide havia um ano. O fator de confusão neste caso foi uma aparente clitoromegalia apresentada pela criança e que posteriormente foi atribuída à prematuridade<sup>21</sup>.

A análise molecular não é a única ferramenta disponível para a elucidação de casos indefinidos. O teste de estímulo com ACTH em muitos casos pode ser útil para a diferenciação das formas clássicas e não clássicas. Entretanto, apesar da padronização dos valores de 17OHP sessenta minutos após a infusão de 0,25mg de ACTH sintético<sup>29</sup>, alguns valores se interpõem podendo gerar dúvidas em alguns casos. Tajima e colaboradores publicaram os casos de quatro crianças que haviam sido triadas pelo PTN do Japão. Todas haviam sido submetidas ao teste de estímulo com ACTH e obtiveram valores compatíveis com a forma não clássica. No entanto após o estudo molecular a HAC foi descartada e os altos níveis de 17OHP foram atribuídos à heterozigose destas crianças<sup>25</sup>.

A utilização da espectrometria de massa em tandem associada à cromatografia líquida (CL-EMEM) é outro exame de maior acurácia que vem sendo avaliada como auxílio diagnóstico nos PTN para HAC e tem apresentado resultados promissores, mas que ainda necessitam ser reproduzidos em outros estudos<sup>6</sup>.

A adoção da genotipagem em larga escala ainda é assunto controverso. Apesar de ser um exame de custo elevado alguns autores ponderam que esse gasto não superaria as despesas que os PTN têm com o acompanhamento clínico de casos não elucidados<sup>21</sup>. Além disso, a realização do estudo molecular poderia reduzir o número de reconvocações e eliminar repetição dos testes hormonais em quase 88% dos casos<sup>23</sup>.

Fitness e colaboradores estudaram a aplicabilidade da genotipagem em larga escala utilizando amostras colhidas em papel filtro. Tal método mostrou-se eficaz em detectar as

nove mutações mais comuns do *CYP21* na Nova Zelândia em um tempo médio de 14 horas<sup>24</sup>.

No entanto, outro argumento contrário à genotipagem em larga escala seria que o objetivo da triagem neonatal na HAC deveria ser a identificação dos quadros graves com risco imediato aos recém nascidos como as formas perdedoras de sal ou as formas virilizantes simples em meninas<sup>30</sup>. Ao se cumprir essa missão, o diagnóstico das formas leves e a elucidação dos casos falsos positivos não deveriam ser uma atribuição dos PTN.

Citando-se novamente Wilson e Jungner, os autores postularam o seguinte: “A idéia central da detecção precoce e tratamento de uma doença é essencialmente simples. No entanto, o caminho para seu sucesso (de um lado, trazendo para o tratamento aqueles com a doença ainda não diagnosticada e por outro lado, evitando prejudicar aqueles que não necessitam tratamento) está longe de ser simples apesar de parecer capciosamente fácil.”<sup>7</sup>

Diante de um exame de triagem positivo, é incalculável o impacto que esta informação pode causar na vida de um paciente ou na de seus familiares. A triagem de pacientes com as formas não clássica, heterozigotos ou com 17-hidroxiprogesteronemia transitória gera angústia na família destas crianças e o anseio pelo esclarecimento diagnóstico. A responsabilidade dos PTN para com estes pacientes portanto existe e não deve ser ignorada.

Diversos PTN optam pelo acompanhamento clínico desses pacientes até a definição diagnóstica ou normalização dos valores de 17-OHP. Tal conduta, apesar de não ser errada, prolonga ainda mais a ansiedade dessas famílias além de onerar os PTN que devem providenciar uma estrutura adequada composta de profissionais de saúde especializados, exames exames frequentes e espaço físico para o acolhimento. A realização da genotipagem como segunda etapa no PTN para HAC traria o benefício da alta precoce das crianças sadias reduzindo-se o tempo de espera das famílias pelo diagnóstico definitivo.

## 8 CONCLUSÕES

A dificuldade de manejo dos pacientes falsos positivos detectados na triagem neonatal para HAC poderia ser amenizada com a utilização da análise molecular do gene *CYP21* como exame de segunda etapa. O exame pode contribuir na distinção precoce de casos graves, possibilitando um tratamento adequado em tempo hábil nestes pacientes e ao mesmo tempo evitando-se o tratamento exacerbado ou desnecessário nos casos leves. Dada a dificuldade indiscutível da realização do diagnóstico de HAC em alguns casos, a análise molecular também se mostra fundamental na elucidação de casos indefinidos. O afastamento de doença em pacientes saudáveis em um momento mais precoce, reduz o tempo de seguimento clínico destas crianças reduzindo consideravelmente tantos os custos monetários para os PTN quanto o custo psicológico para as famílias desses recém nascidos.

## REFERÊNCIAS

1. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1997 Dec;26 (4):853-91
2. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21:245-91.
3. Pang ST, Wallace AM, Hofman L, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988; 81: 866–74.
4. 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; 21(5):455-60.
5. Pezzuti, I. Avaliação do programa-piloto de triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita no Estado de Minas Gerais.2010. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.
6. 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; 95(9):4133-60.
7. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. Geneva: WHO; 1968.
8. Nordenström A, Ahmed S, Jones J, Coleman M, Price DA, Clayton PE. *et al.* Female preponderance in congenital adrenal hyperplasia due to CYP21 deficiency in England: implications for neonatal screening. *Horm Res* 2005; 63:22-28.
9. Therrell BL Jr, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmark J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J & Gum S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998 101 583–590.
10. Pang S, Hotchkiss J, Drash AL, Levine LS, New MI. Microfilter paper method for 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45:1003-8.
11. Pang S. International Newborn Screening Collaborative Study on 21-hydroxylase deficiency. *Pediatric Research* 2003, 53.
12. Mattozo M, Souza LC. Triagem neonatal em Santa Catarina: relato histórico, aspetos fisiopatológicos e métodos de análise realizados pelo Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Estado. *NewsLab* 2005; 68:84-102.

13. 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.
14. Olgemöller 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; 88:5790-4.
15. van der Kamp HJ, Wit JM. 2004 Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 151(Suppl 3):U71–U75
16. Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH) - ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) values. *Steroids* 74 (2009) 662–665.
17. Nordestrom A, Wendell A, Hagenfeldt CM, Larsson A. Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: 17-Hydroxyprogesterone Levels and CYP21 Genotypes in Preterm Infants. *Pediatrics* 2001;108:e68
18. Torresani T, Grueters A, Scherz R, Burckhardt JJ, Harras A, Zachmann M 1994 Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17-hydroxyprogesterone to gestational age. *Screening* 3:77–84
19. Wong T, Shackelton C, Covey T, Ellis G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem.* 1992;38:1830–1837
20. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS. *et al.* Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:320-26.
21. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, Mendonca BB, Bachega TA. Molecular analysis of *CYP21A2* can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet* 2009; 76: 503–510
22. Witchel SF, Nayak S, Suda-Hartman M, Lee PA. Newborn screening for 21-hydroxylase deficiency: results of CYP21 molecular genetic analysis. *J Pediatr.* 1997 Aug;131(2):328-31.
23. Kösel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dörr HG, Roscher AA, Olgemöller B. Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem.* 2005 Feb;51(2):298-304. Epub 2004 Dec 17.



24. Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, Day DJ. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar;84(3):960-6.
25. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Toyoura T, Shimosawa K, Kusuda S, Goji K, Nagashima T, Cutler GB Jr. Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jul;82(7):2350-6.
26. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Mol Diagn.* 2001 Sep;6(3):193-9.
27. Cavarzere P, Samara-Boustani D, Flechtner I, Dechoux M, Elie C, Tardy V, Morel Y, Polak M. 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. Epub 2009 May 18.
28. Fernández BH, Fernández ME, Iñiguez ED, Zubicaray BE, Martín MB, Arnao MD, Sánchez AR. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: transitory elevation of 17-hydroxyprogesterone. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(3-4):155-62.
29. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS. *et al.* Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:320-26.
30. Root AW. Neonatal screening for 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia--the role of CYP21 analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 May;84(5):1503-4.