

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde**

**Patrícia Soares de Castro**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DEFICIÊNCIA DE 21-HIDROXILASE EM  
CRIANÇAS COM ELEVAÇÃO PERSISTENTE DA 17-HIDROXIPROGESTERONA  
APÓS TRIAGEM NEONATAL**

**Belo Horizonte**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Patrícia Soares de Castro**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DEFICIÊNCIA DE 21-HIDROXILASE EM  
CRIANÇAS COM ELEVAÇÃO PERSISTENTE DA 17-HIDROXIPROGESTERONA  
APÓS TRIAGEM NEONATAL**

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

**Orientadora: Ivani Novato Silva**

**Belo Horizonte**  
**2012**

## AGRADECIMENTOS

À Professora e Orientadora Ivani Novato Silva pela disponibilidade de estar comigo nesta etapa, dedicando seu tempo em prol do meu conhecimento. Por exercer o seu ofício com extrema responsabilidade e paciência, estando sempre pronta a me socorrer nos momentos de dúvidas e inseguranças. Pelo carinho, amizade e respeito que tornaram ainda mais agradável minha passagem pela Equipe de Endocrinologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG.

A todos os preceptores da Equipe de Endocrinologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial ao Dr. Chagas por servir de exemplo absoluto na prática da Medicina e da Endocrinologia Pediátrica.

Às minhas colegas, companheiras e amigas da Especialização de Endocrinologia Pediátrica: Gracielly, Juliana, Tatiana, Christiany, Enda, Anaysa, Aline e Isabela por todos os momentos inesquecíveis passados juntas.

À Tatiana Oliveira Rassi por também me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Tânia Bachega e ao Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) pela realização dos estudos moleculares, imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

À equipe do NUPAD/FM/UFMG, em especial à Rita de Cássia que foi de extrema importância para a execução deste trabalho.

A toda minha família pelo apoio incondicional e pelo amor inquestionável, que me fizeram seguir em frente e chegar à conclusão da Especialização de Endocrinologia Pediátrica.

## RESUMO

A triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita (HAC) é importante para prevenção de complicações nas formas graves da doença. Um dos principais problemas durante a sua realização é a detecção de crianças que permanecem com níveis persistentemente elevados de 17-hidroxiprogesterona (17OHP), sem diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilidade do estudo molecular na discriminação entre as crianças afetadas pela doença e aquelas com elevação transitória da 17OHP. Foi realizado estudo molecular do gene CYP21A2 pelos métodos de *Southern blotting* para pesquisar grandes rearranjos gênicos e PCR alelo-específico para identificar mutações de ponto. Foram selecionadas 33 crianças (21 do sexo feminino) com tempo médio de seguimento de 3 anos e 5 meses, sem fenótipo da doença. Dentre elas, 9 eram prematuras, 19 apresentaram intercorrências perinatais e 29 (87,8%) eram adequadas para a idade gestacional. No primeiro exame sérico a mediana da 17OHP foi 1680 ng/dL (293-3350), com valores de referência de 72 ng/dl nas meninas e 82 ng/dl nos meninos e se manteve acima da normalidade, com valores de 171 ng/dl (86-2740) na última avaliação. Foram detectadas mutações em 17 crianças (51,5%), sendo que 7 eram heterozigotas: 5 com mutação do tipo V281L e 2 com Q318X. Em nove foram encontradas alterações compatíveis com a forma não-clássica, sem sinais clínicos da doença, sendo a V281L a mais freqüente em ambos os alelos. No alelo materno detectaram-se também as mutações: -126C>T, -113G>A, -110T>C no promotor do CYP21A2 de uma criança e Q318X, em outra. No paterno um paciente apresentou as alterações Ins T, Q318X, R356W, dois a mutação I2 splice e outro uma grande conversão gênica. Uma criança apresentou a mutação Q318X/I2 splice, compatível com a forma clássica, porém sem sinais clínicos da doença, até o momento. Um alto percentual de diagnósticos de HAC foi realizado nos pacientes desta casuística, o que aponta para a relevância da análise molecular do gene CYP21A2 na elucidação dos prováveis casos falso-positivos durante a realização da triagem neonatal.

**Palavras-chave:** Hiperplasia Adrenal Congênita. 17-hiperhidroxiprogesteronemia. Estudo Molecular.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17-OHP	17-hidroxiprogesterona
ACTH	Corticotrofina
CL-EMEM	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em <i>tandem</i>
D21OH	Deficiência da 21-hidroxilase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
IG	Idade gestacional
PTN	Programa de Triagem Neonatal
RN	Recém-nascido
RIA	Radioimunoensaio
VR	Valores de referência

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Flutuação dos valores de 17OHP em pacientes afetados por HAC...16

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados de 17OHP dos RN com elevação persistente após triagem.....	16
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Perfil perinatal dos pacientes estudados.....	15
Quadro 2- Características clínico-laboratoriais das crianças com diagnóstico de HAC pelo estudo molecular.....	17



## SUMÁRIO

1- Introdução.....	10
2- Objetivo.....	12
3- Casuística e Métodos.....	13
4- Resultados.....	15
5- Discussão.....	18
6- Conclusão.....	22
7- Referências.....	23

## 1- Introdução

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) decorre da insuficiência de enzimas envolvidas na síntese do cortisol, sendo mais freqüente a deficiência da 21-hidroxilase (21OHD). A herança é autossômica recessiva e as mutações responsáveis pela doença envolvem o gene CYP21A2, localizado no braço curto do cromossomo 6, dentro do *locus* dos genes que codificam o complexo principal de histocompatibilidade classe 3. As formas clínicas da doença, clássica perdedora de sal, virilizante simples ou não clássica são definidas pela mutação que pode ser encontrada em homozigose ou em heterozigose composta. Nesta última situação, o alelo alterado que confere maior grau de atividade enzimática é o que predomina na determinação do fenótipo<sup>1,2</sup>.

As crianças que apresentam a doença na forma clássica perdedora de sal apresentam risco aumentado de óbito nos primeiros meses de vida, principalmente as do sexo masculino, que não apresentam alterações na genitália externa. Os sinais e sintomas de insuficiência adrenal podem passar despercebidos ou serem confundidos com outras enfermidades neonatais. Além disso, as crianças do sexo feminino, com alterações na genitália, podem ser incorretamente registradas, com graves conseqüências futuras<sup>3,4</sup>.

Desta forma, por se tratar de doença relativamente freqüente (1:15000 nascidos vivos; Speiser, 2010) e passível de ser detectada por meio de dosagem hormonal (concentração da 17-hidroxiprogesterona), ela tem sido incluída nos programas de triagem neonatal.

Entretanto, um dos principais problemas na realização desta triagem é a detecção de crianças que permanecem com níveis elevados, isolados, de 17-hidroxiprogesterona (17OHP), sem o diagnóstico da doença, os “falso-positivos”. Tal fato é observado, principalmente, em recém-nascidos prematuros, de baixo peso ou com outras intercorrências perinatais<sup>5,6</sup>. Então, estas crianças devem ter acompanhamento muitas vezes prolongado, até a definição do diagnóstico ou normalização das alterações bioquímicas, o que causa desnecessário estresse.

Alternativas propostas para minimizar este problema são adoção de pontos de corte de 17OHP diferenciados de acordo com o peso de nascimento ou idade gestacional e coleta de segunda amostra em casos específicos. Mesmo assim, alguns pacientes permanecem sem elucidação diagnóstica, sendo o estudo molecular do gene CYP21A2 uma opção complementar à triagem<sup>5,7,8,9</sup>.

## **2- Objetivo**

Relatar a viabilidade e os benefícios do estudo molecular na avaliação de crianças triadas em projeto-piloto de triagem neonatal para HAC no estado de Minas Gerais, entre setembro de 2007 e maio de 2008, e que mantiveram os níveis de 17OHP persistentemente elevados.

### 3- Casuística e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os dados foram obtidos no Núcleo de Pesquisa e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD). Todos os participantes foram admitidos no estudo após serem informados sobre a pesquisa e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

O projeto-piloto de triagem para HAC foi incluído no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG). A dosagem da 17OHP dos recém-nascidos foi feita na mesma amostra de sangue coletada em papel-filtro (S&S 903<sup>®</sup>) para a triagem de rotina do PETN-MG (hipotireoidismo, fenilcetonúria, fibrose cística e anemia falciforme) e processada pelo método ELISA (UMELISA 17OHP Progesterona Neonatal<sup>®</sup>; VR-RN ( $\geq 2500$  gr): 80 nmol/L; VR-RN ( $< 2500$  gr ou pretermos): 160 nmol/L.

As crianças que participaram do projeto-piloto entre setembro de 2007 e maio de 2008 e que permaneceram com níveis elevados de 17OHP até junho de 2011, a despeito da ausência de sinais clínicos da doença, foram convidadas à coleta de material para estudo molecular do gene CYP21A2. Estes pacientes eram acompanhados clinicamente por endocrinologistas pediátricos, credenciados ao programa, no Hospital das Clínicas da UFMG e realizavam dosagens séricas periódicas de 17OHP (RIA; VR: 2-72 e 1-82 ng/dl para sexo feminino e masculino, respectivamente). Um dos pais das crianças também deveria ter material colhido para realização de análise de segregação de mutação, pois segmentos do pseudogene podem ser transferidos para o gene ativo e, assim, a identificação de duas mutações no DNA de um indivíduo não é o bastante para conclusão do diagnóstico molecular.

A análise do gene CYP21A2 foi realizada pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

As amostras de DNA foram obtidas de leucócitos de sangue periférico pelo procedimento de precipitação por sais (*salting-out*). O DNA foi avaliado por *Southern*

*Blotting* seguido de hibridação *in situ* com sonda do gene da 21-hidroxilase. Foi utilizado o Kit *SALSA MLPA P050B CAH (MRC-Holland, Amsterdam, The Neatherlands)*, que contém oito conjuntos de sondas específicas para os genes CYP21A2 e CYP21A1P, para confirmar a presença de grandes rearranjos gênicos (ex. deleções no CYP21A2 ou grandes conversões gênicas) nas famílias estudadas, onde o *propositus* teria mutações de ponto no estado homozigótico e apenas um dos pais era heterozigoto para a mesma mutação. Todo o gene CYP21A2, incluindo a região promotora, era amplificado por PCR com *primers* específicos e os produtos eram submetidos a sequenciamento direto.

Após resultado da análise do gene CYP21A2, os pacientes afetados foram classificados, genotipicamente, como compatíveis com a forma clássica ou não clássica da HAC e reexaminados pelos endocrinologistas pediátricos, para avaliação de surgimento de manifestações clínicas e necessidade de continuidade do acompanhamento. Os não afetados foram orientados e receberam alta ambulatorial.

Para análise estatística foi utilizado o software Epi info vs 7 para comparação das variáveis, o teste t-student para comparação de médias e o KW para comparação de medianas. Foi considerado o nível de significância de 5%.

#### 4- Resultados

Após tempo médio de seguimento de 3 anos e 5 meses, 33 crianças foram submetidas ao estudo molecular do gene CYP21A2. Delas, 21 (63,63%) eram do sexo feminino, sendo a média de idade na primeira coleta de sangue em papel filtro de 06 dias  $\pm$  3,19 dias.

O perfil perinatal dos pacientes e mães é apresentado no quadro 1.

Quadro 1- Perfil perinatal dos pacientes estudados

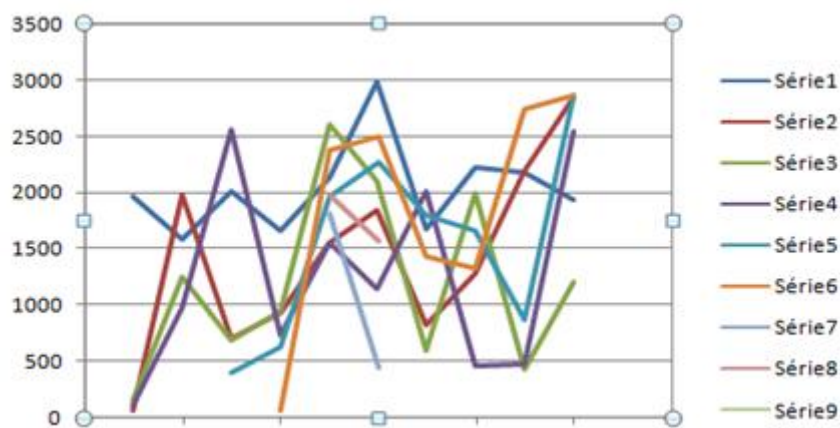
<b>Tipo de parto</b>	70 % (n=23): cesarianos/ 27,7%: prematuros
<b>Idade gestacional</b>	Média: 36,93 $\pm$ 3,32 semanas
<b>Peso de nascimento</b>	Média: 2780,75 gramas $\pm$ 659,33 ; 87,8% eram AIG
<b>Consanguinidade</b>	2 casais; sem história de malformação; 1 mãe heterozigota composta com <i>HAC não clássica</i>
<b>Intercorrências Perinatais</b>  (19 crianças)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>intercorrências maternas:</b> diabetes gestacional, ITU/ nefrolíase, amniorrexe precoce, ameaça de parto prematuro, mioma</li> <li>• <b>intercorrências RNPT:</b> Problemas relacionados à prematuridade: sepse doença da membrana hialina, necessidade de assistência ventilatória, etc</li> <li>• <b>intercorrências RNT:</b> icterícia, aspiração meconial, sofrimento fetal agudo, com asfixia neonatal</li> </ul>
<b>Apgar</b>	1 criança com Apgar de 1º minuto < 7 (RNPT de 28 semanas)

AIG: Adequado para a idade gestacional, ITU: Infecção do trato urinário, RNPT: Recém-nascido pré-termo, RNT: Recém-nascido a termo

A mediana da 17OHP em papel -filtro, 114,11 nmol/L (81,27 -197,93), foi maior entre os prematuros, baixo peso ou com intercorrências perinatais em relação ao grupo total que foi de 106,51 nmol/L (81,27-218,89).

Foi observada grande flutuação dos níveis da 17OHP sérica durante o acompanhamento dos pacientes estudados. A figura 1 retrata esta flutuação entre afetados pela HAC.

Fig 1- Flutuação dos valores de 17OHP em pacientes afetados por HAC



Na tabela 1 são apresentados os resultados de 17OHP dos diferentes grupos analisados. Observa-se que a mediana da 17OHP, na primeira e na última dosagem sérica, foi significativamente mais elevada nos afetados por HAC.

Tabela 1- Resultados de 17OHP dos RN com elevação persistente após triagem

	17OHP* em papel-filtro (nmol/L)	Primeira 17OHP* sérica (ng/dL)	Última 17OHP* sérica (ng/dL)
Heterozigotos (n=07)	97,38 (90-218,89)	1360 (293-2490)	230 (110-604)
Afetados-HAC (n=10)	100,89 (81,27-197,93)	1985 (1580-2990)	1207 (88-2740)
Sem mutações(n=16)	116,08 (87,65-216,39)	1920 (780-3350)	107 (86-434)
Grupo total (n=33)	106,51 (81,27-218,89)	1680 (293-3350)	171 (86-2740)
P valor	0,7018	0,0451	0,0018

\*Mediana (Min-Max)

Foram detectadas mutações em 17 crianças (51,5%), sendo que 7 eram heterozigotas: 5 apresentaram mutação do tipo V281L e 2 Q318X. Em nove foram encontradas alterações compatíveis com a forma não-clássica, sem sinais clínicos da doença, sendo a V281L a mais freqüente em ambos alelos. No alelo materno detectaram-se também as mutações 126>T, 113G>A, 110T>C no promotor do



CYP21A2 de uma criança e Q318X, em outra. No alelo paterno um paciente apresentou as alterações Ins T, Q318X, R356W (cluster), dois a mutação I2 splice e outro uma grande conversão gênica. Uma criança apresentou a mutação Q318X/I2 splice, compatível com a forma clássica sem, no entanto, ter sinais clínicos da doença.

A mutação V281L em homozigose foi encontrada em mãe de criança heterozigota, caracterizando-a como afetada pela forma não clássica.

O Quadro 2 resume as características dos pacientes com diagnóstico de HAC pelo estudo do CYP21A2.

**QUADRO 2. Características clínico-laboratoriais das crianças com diagnóstico de HAC pelo estudo molecular**

Caso	Sexo	IG (semanas)	PN (gramas)	Idade à triagem (dias)	17OHP papel-filtro (nmol/L)	1ª 17OHP sérica (ng/dL)	Última 17OHP sérica (ng/dL)	Análise molecular (AM)	Análise molecular (AP)	Análise molecular Conclusão
1	F	40	3490	5	81,27	2990	1570	V281L	V281L	NC
2	F	40	4085	7	197,93	1940	2060	V281L	InsT, Q318X, R356W	NC
3	M	38	2830	5	104,86	1580	984	V281L	Grande conversão gênica	NC
4	F	38	2420	5	157,88	2220	157	V281L	I2 splice	NC
5	F	39	3390	8	83,08	1670	1430	126>T, 113G>A, 110T>C	V281L	NC
6	F	39	2840	3	96,76	1960	88	Q318X	I2 splice	C
7	M	Termo	3525	7	168,82	2180	2740	Ins T	V281L	NC
8	F	38	2920	7	108,51	2010	400	V281L	I2 splice	NC
9	F	38	2380	10	82,27	2130	2120	V281L	V281L	NC
10	F	42	3380	14	84,55	1660	632	V281L	V281L	NC

IG: Idade gestacional; PN: Peso de nascimento; F: Feminino; M: Masculino; AM: Alelo materno; AP: Alelo paterno; NC: HAC forma Não Clássica; C: HAC forma Clássica

## 5- Discussão

A triagem neonatal para HAC tem contribuído para o diagnóstico e tratamento precoces das formas mais graves da doença. A ocorrência de “falsos-positivos” pode resultar de vários fatores: grandes quantidades de esteróides sulfatados no plasma dos recém-nascidos, como a 17OHpregnenolona, responsáveis por reações cruzadas nos imunoenaios para 17OHP, devido à ausência de anticorpos específicos ou o estímulo para o aumento do ACTH devido ao estresse, com posterior elevação da 17OHP, em crianças pré-termo ou com intercorrências perinatais. A imaturidade renal nestes pacientes, também poderia contribuir devido à diminuição da excreção dos metabólitos da 17OHP<sup>5,6,9,10</sup>. A diferenciação, em crianças assintomáticas, entre as elevações persistentes da 17OHP, hiper17-hidroxiprogesteronemia (hiper17OHPemia), decorrentes dos fatores citados e um defeito enzimático permanente, compatível com genótipo de HAC, torna-se difícil. Além dessas dificuldades, outras podem ocorrer durante o acompanhamento das crianças: como a diferenciação da forma perdedora de sal da virilizante simples em pacientes que iniciaram precocemente o tratamento. Sendo assim, estudos mostram que, devido à boa correlação genótipo-fenótipo, a busca de mutações na análise molecular do gene CYP21A2 seria de grande auxílio na elucidação de casos inconclusivos<sup>11,12</sup>.

Em alguns países a genotipagem para HAC já é usada como complementação à triagem neonatal, e o uso da correlação genótipo-fenótipo de acordo com a mutação encontrada é considerada ferramenta adequada para consolidação diagnóstica<sup>13,14,15,16,17</sup>.

Deleção do CYP21A2 e grandes conversões gênicas foram inicialmente descritas na 21OHD e posteriormente foram identificadas mutações de ponto, por meio de seqüenciamento do gene<sup>11,12,18</sup>. Embora ocorram variações nas diferentes regiões geográficas, na maioria dos estudos são relatadas 9 mutações de ponto principais, responsáveis pelo quadro clínico, sendo observada ótima correlação genótipo-fenótipo<sup>11</sup>.

Em estudos na população brasileira, as 3 mutações de ponto mais encontradas foram I2 splice, I172N e V281L (Mello *et al*), sendo esta última a mais freqüente no presente estudo, tendo sido encontrada em 52,9% de todos os alelos.

Em estudo de correlação genótipo-fenótipo para HAC, em coorte brasileira, a metodologia empregada no estudo foi capaz de identificar mutações compatíveis em 100% de alelos da forma clássica e 85% de alelos relacionados à não-clássica<sup>13</sup>.

Um estudo brasileiro do estado de Goiás, publicado em 2009, chama a atenção para a relevância da definição diagnóstica molecular de 19 pacientes, com 17OHP elevada, assintomáticos. Em 5 deles (26,3%), foram observadas mutações compatíveis com 21OHD: 2 com genótipo referente à forma não clássica e 3 à virilizante simples. Dois meninos apresentaram aceleração da velocidade de crescimento, após este último diagnóstico e puderam ser prontamente tratados. A análise molecular também foi importante para evitar e até corrigir o uso desnecessário de glicocorticóide, como relatado em menina heterozigota que estava sendo tratada devido a uma aparente clitoromegalia que, posteriormente, foi atribuída à prematuridade extrema<sup>13</sup>.

No presente estudo, 51,5% das crianças apresentaram pelo menos uma mutação e 30,3% eram afetados pela doença, percentual discretamente mais elevado em relação ao estudo de Goiás<sup>13</sup>. Foram também observadas mais mutações relacionadas à forma não clássica (apenas uma em 10 crianças tem genótipo da forma clássica) e, até o momento, nenhum paciente necessitou tratamento. Entretanto, o acompanhamento em longo prazo permitirá a detecção de alterações clínicas que requeiram intervenção medicamentosa em algum deles, e esta será iniciada com segurança, sem atraso ou excessos, uma vez que o diagnóstico já foi esclarecido.

Além disso, 70 % dos indivíduos diagnosticados com hiperplasia eram heterozigotos compostos, todos assintomáticos. A heterozigose composta pode ser mais freqüente que a homozigose, nos afetados. Como já foi postulado que o alelo que promove maior comprometimento da atividade enzimática, na forma não clássica, pode influenciar a gravidade do fenótipo, essa identificação pode ser relevante<sup>19</sup>.

Mas o diagnóstico molecular como complementação à triagem neonatal nos pacientes com elevação persistente da 17OHP ainda é controverso. Em estudo europeu de 2009 não foram observadas mutações em crianças com hiper17OHPemia persistente, mas todas aquelas com fenótipo do tipo “perdedor de sal” tinham mutações compatíveis com a forma clínica<sup>14</sup>. Na opinião dos autores, como a triagem não tem como objetivo detectar as formas não clássicas da HAC, os pacientes com essas formas deveriam ser apenas acompanhados para avaliação de sinais de hiperandrogenismo, o que já é feito naqueles com hiper17OHPemia. Adicionalmente, todas as crianças no estudo obtiveram normalização dos níveis de 17OHP até o sexto mês de vida. Diante desse achado, eles concluíram que a genotipagem deveria ser evitada nestes casos e teria maior relevância para informação da gravidade da 21OHD.

No presente estudo, ao contrário, as crianças foram acompanhadas por um período muito maior (média de 3 anos e 5 meses) com concentrações elevadas de 17OHP, sem normalização. Este longo tempo de acompanhamento sem definição diagnóstica causa desconforto para os pais destas crianças e para a equipe de saúde. Além disso, após este período, diminui a probabilidade de que a hiper17OHPemia seja causada apenas por eventos interferentes perinatais.

A identificação da 21OHD nestas crianças por meio apenas das avaliações hormonais não tem se mostrado segura. Há relatos indicando que somente a concentração de 17OHP em papel-filtro não é útil para diferenciar indivíduos normais de doentes e outros nos quais se observou que a 17OHP nos falso-positivos foi significativamente mais baixa que nos doentes, apesar de ter ocorrido sobreposição de valores de 17OHP entre os dois grupo<sup>5,7</sup>. A sobreposição dos valores de 17OHP sérica também é observada, como ocorreu, no presente estudo, entre todos os grupos de crianças estudadas, embora as concentrações de 17OHP fossem mais elevadas nas crianças afetadas. Por meio do estímulo com ACTH sintético é possível discriminar os indivíduos heterozigotos para mutações no CYP21A2, que respondem ao teste com níveis mais altos de 17OHP em relação às pessoas sem mutações, mas esta discriminação não se aplica para os valores basais<sup>17,20</sup>. O teste de estímulo com ACTH é utilizado, principalmente, para reconhecimento das formas não clássicas de 21OHD, mas pode haver sobreposição de valores, em relação aos pontos de corte para diagnóstico, entre as diferentes formas de hiperplasia<sup>20,21,22,23</sup>.

O uso de métodos, para dosagem de 17OHP, de maior especificidade, como a espectrometria de massa em *tandem* associada à cromatografia líquida (CL-ENEM), pode reduzir o número de resultados falso-positivos, mas ainda não os afasta completamente, uma vez que não elimina a interferência do estresse ocasionado pelas intecorrências perinatais na elevação da 17OHP<sup>24,25</sup>.

Deste modo como não há, ainda, maneira eficaz para a eliminação dos resultados falso-positivos na triagem neonatal para HAC, a utilização dos métodos complementares é desejável para melhorar o manejo dessas crianças. E ainda, para minimizar o sofrimento familiar relacionado à indefinição diagnóstica após a triagem neonatal e o prejuízo imputado às crianças, devido às coletas freqüentes de sangue para exames laboratoriais e consultas médicas rotineiras. De maior gravidade, mas infelizmente, de ocorrência não rara, é a instituição de tratamento equivocado para um diagnóstico não confirmado, que também poderia ser evitado.

O estudo molecular do gene CYP21A2 aumenta, inevitavelmente, os custos da triagem, se for realizada rotineiramente. No entanto a análise aprofundada deve levar em consideração que o estudo molecular poderia diminuir o número de reconvocações e eliminar a necessidade de novo teste em 88% dos casos<sup>7</sup>. Comparando-se a análise molecular com o gasto para acompanhamento das crianças com resultados falso-positivos foram relatados custos de \$500 e \$848, respectivamente<sup>7</sup>. Considerando o relato de tendência de normalização da 17OHP nos primeiros seis meses de vida (Cavarzere *et al*) mais estudos são necessários para indicar a época mais adequada para realização da genotipagem com o melhor custo-benefício.

## 6- Conclusão

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que o estudo molecular foi decisivo para o diagnóstico de HAC em 30% das crianças com 17OHP persistentemente elevada, mostrando-se relevante para nortear o acompanhamento e evitar instituição desnecessária de terapêutica nessas crianças, além de contribuir para redução do estresse familiar e custos com o acompanhamento relacionado ao possível diagnóstico de HAC nos outros 70%.

## 7- Referências

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21:245-91.
2. 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.
3. Speiser PW, White PC. *et al.* *New England Journal of Medicine* 349; 8 agosto 2003 pag 776 a 788.
4. Hindmarsh PC. *et al.* Management of the child with congenital adrenal Hyperplasia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23 (2009) 193–208.
5. Van der Kamp HJ, Wit JM. 2004 Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 151(Suppl 3):U71–U75.
6. 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 (4):E68.
7. 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.

8. Lee JE, Moon Y, Lee MH, Jun YH, Oh KI, Choi JW. et al. Corrected 17-Alpha-Hydroxyprogesterone Values Adjusted by a Scoring System for Screening Congenital Adrenal Hyperplasia in Premature Infants. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 38, no. 3, 2008, pag 235 a 240.
9. Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, Oliveira E, Brito VN, Mendonça BB, Bachega TAS. et al. Weight-adjusted neonatal 17OHprogesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55/8 pag 632 a 637.
10. Kwon C, Farrell PM. et al. The Magnitude and Challenge of False-Positive Newborn Screening Test Results. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000;154:714-718.
11. Mello MP, Bachega TAS, Costa-Santos M, Mermejo, LM, Castro M. et al. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 46 nº 4 Agosto 2002, pag 457 a 477.
12. Bachega TAS, Billerbeck AEC, Parente EB, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Mello MP, Guerra G, Kuperman H, Setian N, Damiani D, Torres N, Castro M, Mendonça BB. Estudo Multicêntrico de Pacientes Brasileiros Com Deficiência da 21-Hidroxilase: Correlação do Genótipo Com o Fenótipo. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 48 nº 5 Outubro 2004 pag. 697 a 704.
13. 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.
14. Cavarzere P, Samara-Boustani D, Flechtner I, Dechaux 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.

15. Malikova J, Votava F, Vrzalova Z, Lebl, Cinek O. et al. Genetic analysis of the CYP21A2 gene in neonatal dried blood spots from children with transiently elevated 17-hydroxyprogesterone. Accepted Article, doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04358.x.
16. Nordenström A, Thilén A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wendell A. et al. Genotyping Is a Valuable Diagnostic Complement to Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999 Vol 84 No 5 pag 1505 a 1509.
17. Soardi FC, Lemos-Marini SF, Coeli FB, MaturanaVG, Silva MDB, Justo GZ, De-Mello M. Heterozygosis for CYP21A2 Mutation Considered as 21-Hydroxylase Deficiency in Neonatal Screening. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52/8 pag 1388 a 139.
18. Campos VC, Pereira RMC, Torres N, Castro M, Agiar-Oliveira MH. High frequency of Q318X mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Northeast Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53/1 pag 40 a 46.
19. Corrêa FA, Bachega TAS. et al. Avaliação dos Critérios Diagnósticos Hormonais da Forma Não Clássica da Deficiência da 21-Hidroxilase Através do Estudo Molecular do Gene CYP21A2. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 47 nº 5 Outubro 2003 pag 622 a 631.
20. New MI. et al. Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency. (*J Clin Endocrinol Metab* 91: 4205–4214, 2006.

21. Shah AS, Backeljauw PF. et al. Non-classic congenital adrenal hyperplasia. Clinical experience versus clinical guidelines. *Endocrinology Studies* 2011; 1:e11 pag 45 a 49.
22. Speiser PW. et al. Nonclassic adrenal hyperplasia. *Rev Endocr Metab Disord* (2009) 10:77–82.
23. Witche, SF. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012, 19:151–158.
24. Sugawara EK, Ribeiro Neto LM, Fernandes VFT, Kater CE, Verreschi ITN. et al. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação direta da 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona sérica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; set 2004; vol 40 n 3, 327 a 333.
25. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U, Sander J. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: Additional Steroid Profile using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(7):2581–2589.