

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

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

**AVALIAÇÃO DO PROGRAMA-PILOTO DE TRIAGEM  
NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA  
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**ISABELA LEITE PEZZUTI**

**Belo Horizonte**

**2010**

**ISABELA LEITE PEZZUTI**

**AVALIAÇÃO DO PROGRAMA-PILOTO DE TRIAGEM  
NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA  
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Ivani Novato Silva.

**Belo Horizonte**

**2010**

P522a Pezzuti, Isabela Leite.  
Avaliação do programa-piloto de triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita no estado de Minas Gerais [manuscrito]. / Isabela Leite Pezzuti. - - Belo Horizonte: 2010.  
94f.: il.  
Orientadora: Ivani Novato Silva.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hiperplasia Supra-Renal Congênita. 2. Triagem Neonatal. 3. 17-alfa-Hidroxiprogesterona. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ivani Novato. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WS 330

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Clélio Campolina Diniz

**Vice-reitora:** Prof<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-reitor de Pós-Graduação:** Prof. Ricardo Santiago Gomez

**Pró-reitor de Pesquisa:** Prof. Renato de Lima Santos

### **Faculdade de Medicina:**

**Diretor:** Prof. Francisco José Penna

**Vice-diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:** Prof<sup>a</sup>. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

### **Departamento de Pediatria:**

**Chefe:** Prof<sup>a</sup>. Benigna Maria de Oliveira

### **Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:**

**Coordenadora *pro tempore*:** Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões e Silva

#### **Membros do Colegiado da Pós-graduação:**

Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões e Silva

Prof<sup>a</sup>. Ivani Novato Silva

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof<sup>a</sup>. Lúcia Maria Horta Figueiredo Goulart

Prof<sup>a</sup>. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof. Marco Antônio Duarte

Michelle Ralil da Costa

Ao Marcelo,  
pelo incentivo e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Ivani Novato Silva, minha orientadora, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo incentivo à minha formação. Agradeço pela disponibilidade, paciência, sabedoria e carinho. Espero poder retribuir sempre da mesma forma.

Ao Professor Antônio José das Chagas, pela sabedoria, paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À colega e amiga, Cristina Barra, pelo inestimável auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Ao Professor José Nélio Januário, diretor do NUPAD/FM/UFMG, pela atenção e colaboração.

À equipe do NUPAD/FM/UFMG, em especial à Rita de Cássia Afonso, Jeferson Gonçalves de Oliveira, Silvânia Ferreira e Roberto Vagner Puglia Ladeira, que não pouparam esforços para me ajudar neste trabalho.

Ao Fernando Henrique Pereira e ao Rafael Ruiz Combat Furtado, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À professora Magda Barbosa Roquete Taranto, pela revisão do português e formatação do texto.

Aos colegas da Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, pela amizade. Gostaria de agradecer especialmente à Ana Luíza Aragão, Rafael Mantovani e Samuel Dutra, pela dedicação aos pacientes da triagem.

Aos professores, colegas e secretárias do curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo estímulo e atenção.

Aos colegas do Centro de Saúde Independência, em especial à Renata Mascarenhas e à Roberta Magalhães, pela confiança no meu trabalho.

A toda a minha família e a todos os meus amigos, que são parte desta conquista, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu marido, Marcelo, pelo amor, incentivo, compreensão e colaboração constantes.

Ao NUPAD/FM/UFMG, que proporcionou o apoio logístico e financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

A todas as crianças que participaram deste estudo, pelo aprendizado que me proporcionaram.

**“Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes:  
saber e crer que se sabe.  
A ciência consiste em saber;  
em crer que se sabe está a ignorância.”**

**Hipócrates**



## RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) pode ser considerada adequada para ser incluída nos programas de triagem neonatal, por ser uma doença relativamente frequente na população, potencialmente fatal e que pode ser triada por simples dosagem hormonal. Além disso, o diagnóstico e o tratamento precoces podem prevenir crise grave de perda de sal, reduzindo a morbimortalidade. O objetivo do estudo foi avaliar o programa de triagem neonatal para HAC implantado no estado de Minas Gerais, como projeto-piloto, entre 1º/09/2007 e 1º/05/2008. A triagem para HAC foi incluída no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), que abrange 100% dos municípios do estado e realiza rotineiramente a pesquisa de quatro doenças (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias e fibrose cística). A coleta de sangue em papel-filtro é realizada no quinto dia de vida por punção do calcanhar dos recém-nascidos. A dosagem da 17-OHP foi realizada utilizando o ensaio UMELISA 17OH Progesterona NEONATAL®, com valor de normalidade estabelecido em 80 nmol/L. A partir de 29/11/2007, foi adotado ponto de corte específico para crianças com peso ao nascimento inferior a 2.500g ou prematuras (160 nmol/L). Foram triadas 159.415 crianças, com incidência para a forma clássica da doença de 1:19.927. Entre as oito crianças doentes (cinco meninas), seis eram perdedoras de sal. Em 50% das crianças não houve suspeita clínica da doença e o diagnóstico foi atribuído inteiramente à triagem. A mediana de idade ao início do tratamento foi de 39 dias. A mediana da 17-OHP em papel filtro das crianças doentes foi de 250 nmol/L e das crianças falso-positivas de 132 nmol/L ( $p < 0,001$ ). A taxa de falso-positivos foi de 0,31% e o VPP, 2,1%. As sensibilidade e especificidade foram 100 e 99,7%, respectivamente. Entre as 315 crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG, 62% eram do sexo masculino, 76% apresentavam história de intercorrência perinatal e 63% eram prematuras e/ou tinham baixo peso ao nascimento. O tempo de acompanhamento das crianças falso-positivas foi longo (mediana de 17 meses de vida à alta), sendo que a mediana do tempo para normalização da 17-OHP sérica (13,5 meses) foi significativamente mais alta do que da androstenediona sérica (3,3 meses;  $p < 0,001$ ). Quarenta e oito crianças falso-positivas (15%) ainda permaneciam em observação clínica em 20/07/2010, com idade, à última avaliação, de  $24 \pm 6$  meses. Houve correlação inversa entre os níveis de 17-OHP em papel-filtro e peso ao nascimento da população triada ( $p < 0,001$ ). A utilização de novos pontos de corte, baseados no percentil 99 da 17-OHP para quatro categorias de peso ( $\geq 2.500g$ ; 2.000-2.499g; 1.500-1.999g e  $< 1.500g$ ), levaria à redução de 82% na taxa de falso-positivos encontrada, sem prejuízo da sensibilidade e com aumento de cinco vezes no VPP. Os resultados - incidência relativamente alta da doença, com perspectiva de redução significativa da morbimortalidade - justificam a implantação da triagem neonatal para HAC no estado. Os parâmetros obtidos como boa sensibilidade e especificidade do teste com perspectiva de redução da taxa de falso-positivos e melhora do VPP demonstram a viabilidade da triagem e a possibilidade de implantação de um programa com ótima relação custo-eficácia.

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

## ABSTRACT

### **Evaluation of pilot newborn screening program for congenital adrenal hyperplasia in the state of Minas Gerais**

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. Moreover, early recognition and treatment can prevent severe salt wasting, reducing morbidity and mortality. The aim of this study was to evaluate the neonatal screening program for CAH established in the state of Minas Gerais, as a pilot project, between 09/01/2007 and 05/01/2008. Screening for CAH was included in the Newborn Screening Program of the State of Minas Gerais (PETN-MG), which covers 100% of the municipalities of the state and routinely conducts research on four diseases (phenylketonuria, congenital hypothyroidism, hemoglobinopathies and cystic fibrosis). Heel-puncture blood samples are collected on filter paper on day fifth after birth. Dried blood samples were analyzed for 17-OHP by UMELISA 17OH Progesterona Neonatal® assay. Normal range was established at 80 nmol/L. Since 11/29/2007 it was adopted a specific cut-off for children with birth weight less than 2,500g or preterm (160 nmol/L). A total of 159,415 children were screened. The incidence for the classic form of the disease was 1:19,927. Among the eight children detected (five females), six had the salt wasting form of the disease. Four children were clinically unsuspected and diagnosis was entirely attributable to neonatal screening. Therapy was started at a median age of 39 days. The median 17-OHP on filter paper of affected children was 250 nmol/L and of false-positive children was 132 nmol/L ( $P < 0.001$ ). False-positive rate was 0.31% and PPV was 2.1%. The sensitivity and specificity were 100 and 99.7%, respectively. Among the 315 false-positive children followed by PETN-MG, 62% were male, 76% had history of perinatal complications and 63% were premature and/or had low birth weight. The follow-up of false-positive children was long (median of 17 months of life at discharge), and the median time to normalization of serum 17-OHP levels (13.5 months) were significantly higher than that of serum androstenedione (3.3 months;  $p < 0.001$ ). Forty-eight false-positive children (15%) were still under clinical observation at 07/20/2010, with age of  $24 \pm 6$  months in last evaluation. Median 17-OHP values on filter paper were inversely related to birth weight in screened population ( $p < 0.001$ ). The use of new cut-offs, based on 99<sup>th</sup> percentile of 17-OHP according to 4 birth weight groups ( $\geq 2,500$ g; 2,000-2,499g, 1,500-1,999g and  $< 1,500$ g), would lead to a reduction in 82% of the false-positive rate without loss of sensitivity and a 5-fold increase in PPV. The findings - relatively high incidence of the disease with the prospect of significant reduction in morbidity and mortality - justify the implementation of neonatal screening for CAH in the state of Minas Gerais. The parameters obtained as good sensitivity and specificity of the test with the prospect of reducing false-positive rate and improving PPV, demonstrate the feasibility of neonatal screening and the possibility of establishing a cost-effectiveness program.

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

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -OH	11 $\beta$ -hidroxilase
17 $\alpha$ -OH	17 $\alpha$ -hidroxilase
17-OHP	17-hidroxiprogesterona
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
18-OH	18-hidroxilase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
ACTH	Corticotrofina
APAE	Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CL-EMEM	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em <i>tandem</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
D21-OH	Deficiência da 21-hidroxilase
DELFLIA	<i>Dissociation-enhanced, lanthanide fluorescence immunoassay</i>
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EM	Espectrometria de massa
EUA	Estados Unidos da América
F	Feminino
FIA	Imunofluorimetria
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
IG	Idade gestacional
K	Potássio
M	Masculino
MS	Ministério da Saúde
Na	Sódio

NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PETN-MG	Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais
PN	Peso de nascimento
PS	Forma perdedora de sal
RIA	Radioimunoensaio
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Serviço Único de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPP	Valor preditivo positivo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

- FIGURA 1 Esquema da esteroidogênese adrenal demonstrando o bloqueio enzimático na deficiência da 21-hidroxilase..... 19
- FIGURA 2 Fluxograma da triagem neonatal para HAC - PETN-MG..... 36

### Gráficos

- GRÁFICO 1 Histograma ilustrando a distribuição dos valores de 17-OHP na população triada entre 09/2007 e 02/2008..... 43
- GRÁFICO 2 Distribuição dos valores de 17-OHP, de acordo com quatro grupos de peso..... 44
- GRÁFICO 3 Intercorrências perinatais nas crianças falso-positivas..... 45
- GRÁFICO 4 Distribuição das crianças falso-positivas com baixo peso ao nascimento, em três grupos: 2.000-2.499 g, 1.500-1.999 g e <1.500 g..... 46
- GRÁFICO 5 Distribuição dos valores de 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro, entre crianças falso-positivas e doentes..... 48
- GRÁFICO 6 Distribuição dos valores de 17-OHP sérica entre crianças falso-positivas e doentes..... 49
- GRÁFICO 7 Distribuição dos valores da androstenediona sérica entre crianças falso-positivas e doentes..... 49
- GRÁFICO 8 Distribuição dos valores da testosterona sérica entre crianças falso-positivas e doentes..... 50

### Quadros

- QUADRO 1 Resumo da triagem neonatal para HAC em alguns países europeus..... 30
- QUADRO 2 Valores de referência da 17-OHP sérica..... 34
- QUADRO 3 Valores de referência da androstenediona sérica..... 34
- QUADRO 4 Valores de referência da testosterona sérica..... 35
- QUADRO 5 Resumo das principais características das crianças doentes..... 40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Resumo das ocorrências na triagem neonatal para HAC no período de 09/2007 a 02/2008.....	42
TABELA 2 Resultados da triagem para HAC, entre 09/07 e 02/2008.....	42
TABELA 3 Características das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG.	45
TABELA 4 Mediana da 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro em relação a: intercorrência perinatal, idade gestacional e peso ao nascimento, nas crianças falso-positivas.....	47
TABELA 5 Comparação das medianas (variações) dos esteroides adrenais entre crianças falso-positivas e doentes do período de 09/2007 a 02/2008.....	47

# SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Hiperplasia adrenal congênita.....	18
2.1.1 Patogênese.....	18
2.1.2 Manifestações clínicas.....	19
2.1.3 Perfil hormonal.....	21
2.1.4 Triagem neonatal.....	21
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
4.1 Casuística.....	32
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 Projeto-piloto.....	32
4.2.2 Análise dos dados.....	37
4.2.2.1 Análise estatística.....	38
4.2.3 Aspectos éticos.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Incidência da HAC.....	39
5.2 Caracterização das crianças doentes.....	39
5.3 Análise da população triada no período de 1º/09/07 a 26/02/2008.....	41
5.3.1 Ocorrências na triagem.....	41
5.3.2 Distribuição dos valores de 17-OHP, em papel-filtro, da população triada.....	43
5.3.3 Caracterização das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG.....	44
5.3.3.1 Características gerais.....	44

---

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

5.3.3.2 Características laboratoriais.....	46
5.3.3.3 Análise genética.....	50
5.3.3.4 Crianças ainda em observação clínica em 20/07/2010.....	51
5.3.4 Proposta de novos pontos de corte para a 17-OHP.....	51
6 DISCUSSÃO.....	53
6.1 Triagem neonatal: histórico e considerações gerais.....	53
6.2 Triagem neonatal para HAC: experiência no Brasil.....	56
6.3 Achados da triagem para HAC em Minas Gerais.....	58
6.3.1 Incidência da HAC.....	58
6.3.2 Avaliação dos benefícios e dificuldades na detecção das crianças doentes.....	59
6.3.3 Perspectivas de avanço na operacionalização da triagem.....	62
6.3.4 Fatores relacionados à ocorrência de falso-positivos.....	64
6.3.4.1 Fatores gerais.....	64
6.3.4.2 Fatores laboratoriais.....	65
6.3.4.3 Fatores genéticos.....	66
6.3.5 Crianças ainda em observação clínica em 20/07/2010.....	67
6.3.6 Análise da viabilidade de implantação do programa de triagem para HAC em Minas Gerais.....	68
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
8 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS E APÊNDICES.....	86



## 1 INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) por deficiência da 21-hidroxilase (D21-OH) é um dos mais frequentes erros inatos do metabolismo. A incidência mundial da forma clássica da doença é estimada em 1:15.000 nascidos vivos<sup>1</sup>. A enzima 21-hidroxilase participa da síntese de glico e mineralocorticoides no córtex adrenal. Na forma clássica da doença, o acúmulo de esteroides adrenais anteriores ao bloqueio enzimático leva à produção excessiva de andrógenos com virilização pré-natal da genitália externa de crianças do sexo feminino. Além disso, em 75% das crianças afetadas ocorre deficiência concomitante de cortisol e aldosterona. Com isso, essas crianças apresentam crise de perda de sal nas primeiras semanas de vida e estão sob risco de morte se não forem diagnosticadas e tratadas precocemente<sup>2</sup>.

É muito difícil realizar o diagnóstico clínico da HAC no período neonatal, particularmente em crianças do sexo masculino que não possuem alteração da genitália externa ao nascimento. Os sinais e sintomas decorrentes da insuficiência adrenal podem ser bastante inespecíficos. As crianças afetadas podem apresentar inicialmente apenas perda de peso persistente<sup>3</sup>. Outras manifestações como vômitos e diarreia frequentemente conduzem ao diagnóstico equivocado de doenças mais comuns, como a doença do refluxo gastroesofágico ou a gastroenterite infecciosa.

O diagnóstico bioquímico da HAC é realizado pela dosagem plasmática da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), o substrato da enzima 21-hidroxilase que se acumula nas crianças afetadas. As crianças com a forma grave perdedora de sal apresentam hiponatremia e hipercalemia, além do aumento da atividade plasmática de renina. O tratamento da doença por meio da reposição contínua de glicocorticoide e mineralocorticoide é eficaz na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e no controle da produção excessiva de andrógenos.

A partir de 1977, tornou-se possível o diagnóstico precoce da HAC por D21-OH por meio da triagem neonatal, quando Pang *et al.* descreveram uma técnica de ensaio para a dosagem da 17-OHP a partir do sangue de recém-nascidos colhido em papel-filtro. Esses autores realizaram um programa-piloto no Alasca, que demonstrou a viabilidade da triagem neonatal para HAC, hoje realizada de rotina em muitos países<sup>4,5</sup>.

A HAC por D21-OH é considerada doença elegível para ser incluída nos programas de triagem neonatal, por ser relativamente frequente, potencialmente fatal na infância e que pode ser triada por medida hormonal simples. Além disso, possui tratamento eficaz, simples e de baixo custo que, quando instituído precocemente, pode prevenir morbimortalidade.

Algumas das evidências que sustentam a eficácia da triagem neonatal para HAC baseiam-se nas diferenças observadas na incidência, relação entre os sexos e o espectro da doença entre populações triadas e não triadas.

Quando a triagem não é realizada, recém-nascidos do sexo masculino ficam sem o diagnóstico da doença até que se verifique perda de sal significativa. Já recém-nascidos do sexo feminino com a forma clássica da doença apresentam genitália ambígua ao nascimento e podem ser registradas e criadas indevidamente como meninos. Além do risco de morte por crise adrenal, também há evidências de déficits intelectuais e dificuldades de aprendizado secundários à hiponatremia grave<sup>6</sup>.

Apesar dessas evidências, a triagem para HAC ainda não é universal e seus reais benefícios ainda são amplamente discutidos. No Brasil, é realizada como rotina no sistema público de saúde apenas nos estados de Goiás e Santa Catarina<sup>7,8</sup>.

Em Minas Gerais, um projeto-piloto de triagem neonatal para HAC foi implantado entre setembro de 2007 e maio de 2008.

O objetivo da presente dissertação é analisar os resultados desse projeto para avaliar a viabilidade da implantação da triagem de rotina no estado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hiperplasia adrenal congênita

#### 2.1.1 Patogênese

O termo hiperplasia adrenal congênita (HAC) refere-se a um grupo de doenças de caráter autossômico recessivo caracterizado pela deficiência de uma das enzimas necessárias para a síntese de cortisol, a partir do colesterol, no córtex adrenal. Mais de 90% dos casos são resultantes da D21-OH, causada por mutações no gene CYP21A2, localizado no cromossomo 6p21.3. Mais de 100 mutações já foram descritas como causadoras da doença<sup>9</sup>. A maioria das mutações é decorrente de recombinação gênica entre o CYP21A2 e um gene inativo altamente homólogo, o pseudogene CYP21A1P<sup>10</sup>. Nove mutações de ponto são descritas mais frequentemente nas diversas populações estudadas (I2 *splice*, I172N, V281L, R356W, Q318X, P30L, Del 8bp, Cluster exon 6, insT) e estão presentes normalmente no pseudogene, sugerindo que foram transferidas para o gene ativo a partir de eventos de microconversões, devido ao emparelhamento desigual desses genes durante a meiose. Outras mutações descritas são os grandes rearranjos (deleção do gene CYP21A2 e grandes conversões gênicas).<sup>11</sup>

A HAC por D21-OH é um dos mais frequentes erros inatos do metabolismo. A enzima 21-hidroxilase participa da síntese de glicocorticoides e mineralocorticoides, catalizando a conversão de 17-OHP em 11-deoxicortisol, um precursor do cortisol, e a conversão de progesterona em deoxicorticosterona, um precursor da aldosterona (FIG. 1). Devido à perda de função dessa enzima, os pacientes não conseguem sintetizar cortisol eficientemente, levando a aumento compensatório, por mecanismo de *feedback*, na produção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e corticotrofina (ACTH) pelo hipotálamo e hipófise, respectivamente. O aumento de ACTH estimula a produção excessiva de precursores do cortisol, anteriores ao bloqueio enzimático, e causa hiperplasia do córtex adrenal. Esses precursores em excesso são desviados para a produção de hormônios sexuais, com conseqüente virilização de recém-nascidos do sexo feminino (genitália ambígua) e crescimento pós-natal acelerado em ambos os sexos. Além disso, nos casos de deficiência enzimática grave, há deficiência concomitante de aldosterona, com

crises de perda de sal nas primeiras semanas de vida (desidratação, hiponatremia, hipercalemia e choque)<sup>12,13</sup>.

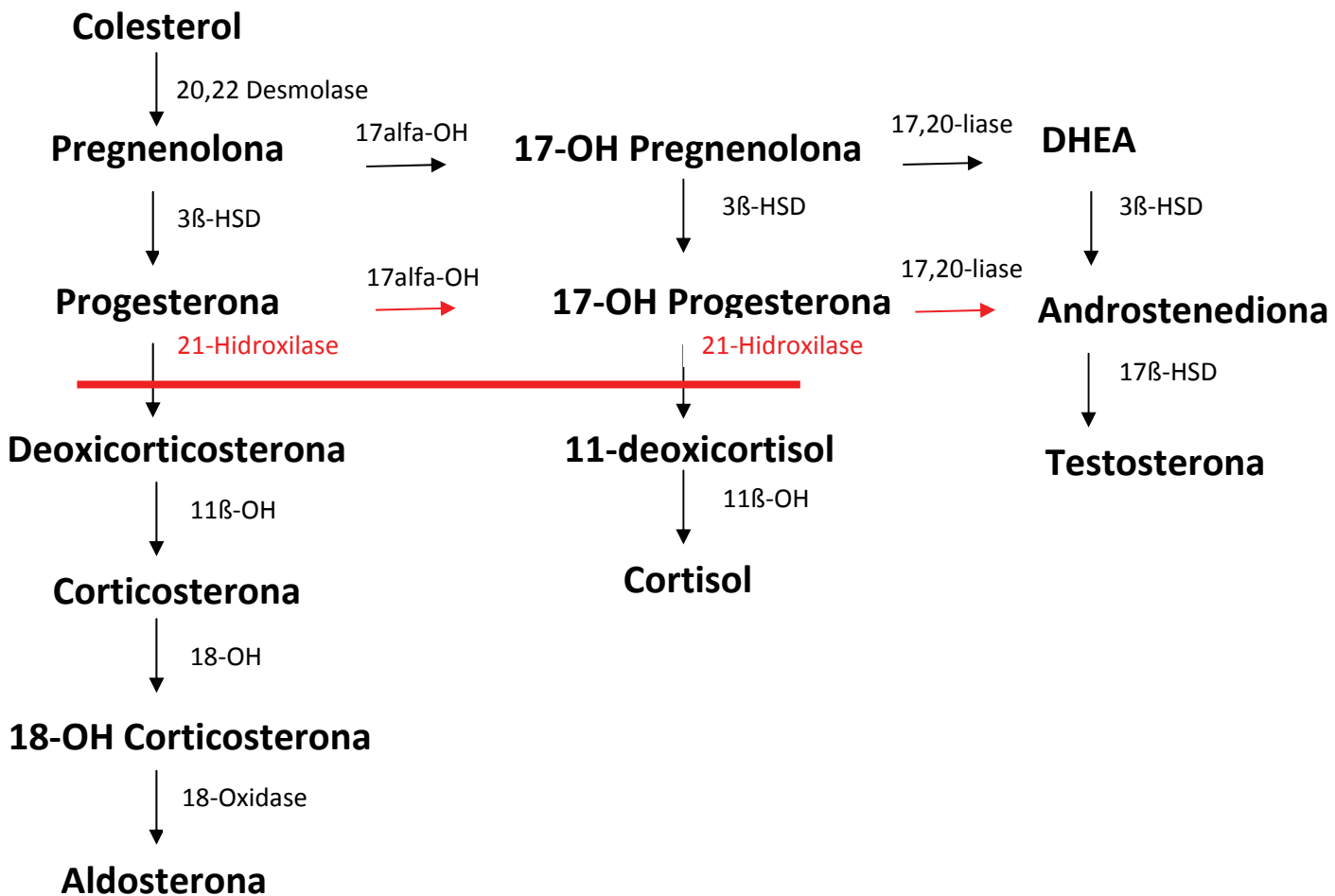


FIGURA 1 - Esquema da esteroidogênese adrenal demonstrando o bloqueio enzimático na deficiência da 21-hidroxilase.

17α-OH: 17α-hidroxilase, 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide desidrogenase, 11β-OH: 11β-hidroxilase, 18-OH: 18-hidroxilase, 17β-HSD: 17β-hidroxiesteroide desidrogenase, DHEA: Dehidroepiandrosterona.

Adaptada da referência 3.

### 2.1.2 Manifestações clínicas

A HAC por D21-OH apresenta-se em duas formas clínicas: a forma clássica e a forma não clássica ou tardia. A primeira é aquela com manifestações clínicas desde o nascimento e é ainda subdividida em forma perdedora de sal (75% dos casos) e forma virilizante simples (25% dos casos), de acordo com a capacidade do paciente de produzir

aldosterona. Recém-nascidos do sexo feminino que apresentam a forma clássica da doença nascem com genitália ambígua, devido à exposição pré-natal, em estágios críticos da diferenciação sexual, a andrógenos potentes. Essas meninas nascem apresentando desde clitoromegalia discreta até virilização completa da genitália (Prader I a V)<sup>14</sup>, podendo ser confundidas com meninos com testículos crípticos<sup>15</sup>. Já os recém-nascidos do sexo masculino com a forma clássica perdedora de sal da doença não têm sinais clínicos evidentes ao nascimento e, por isso, estão particularmente sob risco de desidratação e morte.

A crise adrenal ou crise de perda de sal pode manifestar-se como vômitos, diarreia, choro fraco, ganho de peso insuficiente, desidratação e letargia. Ocorre geralmente nas primeiras semanas de vida (pico na terceira semana) e os sintomas podem não ser evidentes até que as concentrações do sódio atinjam 125 mmol/L. Se não tratada, evolui inevitavelmente para colapso circulatório, choque e morte<sup>16</sup>.

Indivíduos com a forma não clássica ou tardia da doença podem ser assintomáticos ou apresentar sinais de hiperandrogenismo mais tardiamente na infância ou na vida adulta<sup>17</sup>.

As manifestações clínicas da HAC por D21-OH dependem do tipo de mutação no gene CYP21A2 e, conseqüentemente, do grau da deficiência enzimática. A maioria dos pacientes é heterozigota composta (possuem mutações diferentes em cada um dos alelos) e, por isso, amplo espectro de fenótipos pode ser observado. O fenótipo geralmente está relacionado ao alelo que possui a mutação mais leve, ou seja, ao alelo com mais atividade residual enzimática<sup>6,18</sup>.

Grandes deleções no gene CYP21A2 e a mutação *splice* no intron 2 provocam ablação total da atividade enzimática e são encontradas em cerca de 50% dos alelos da forma clássica da HAC<sup>18</sup>. A mutação I172N, que preserva aproximadamente 3% da atividade enzimática, permite que seja produzida quantidade suficiente de aldosterona para impedir crise de perda de sal, o que faz com que esteja geralmente associada à forma clássica virilizante simples da doença<sup>11</sup>. Cerca de 70% dos alelos mutantes da forma não clássica ou tardia apresentam a mutação de ponto no exon 7 (V281L) que preserva 20 a 50% da função enzimática<sup>19</sup>. Outra mutação também associada à forma não clássica é a P30L<sup>11</sup>.

### 2.1.3 Perfil hormonal

A forma clássica da HAC por D21-OH é caracterizada por níveis séricos muito elevados de 17-OHP, o principal substrato da enzima. Uma 17-OHP sérica basal muito elevada (superior a 8.000 ng/dL ou 242 nmol/L) estabelece o diagnóstico da doença<sup>20</sup>. Classicamente, os pacientes com a forma perdedora de sal apresentam concentrações mais elevadas de 17-OHP do que os virilizantes simples, que, por sua vez, apresentam concentrações mais elevadas do que os portadores da forma não clássica da doença. Os níveis basais de 17-OHP de pacientes com a forma não clássica podem ser normais.

O padrão-ouro para diagnosticar casos limítrofes e para diferenciar a D21-OH de outros defeitos enzimáticos esteroidogênicos é o teste de estímulo com ACTH (teste da cortrosina). Realiza-se a dosagem de 17-OHP e de precursores do cortisol, basal e 60 minutos após 0,25 mg de corticotrofina endovenosa. Pacientes com a forma perdedora de sal geralmente possuem níveis de 17-OHP, após estímulo, de até 100.000 ng/dL; os com a forma virilizante simples, entre 10.000 e 30.000 ng/dL; e com a forma não clássica da HAC, entre 1.500 e 10.000 ng/dL. Pacientes com mutação em apenas um alelo do gene CYP21A2 (heterozigotos) podem ter níveis de 17-OHP elevados após estímulo (300 a 1.499 ng/dL), enquanto em indivíduos sem mutação os níveis geralmente são inferiores a 300 ng/dL<sup>13</sup>.

Outros esteroides que podem estar elevados em pacientes com HAC por D21-OH são a progesterona, a androstenediona e, em grau mais baixo, a testosterona. O 21-deoxicortisol também pode estar elevado, mas não é rotineiramente dosado<sup>21</sup>.

### 2.1.4 Triagem neonatal

O diagnóstico precoce da HAC por D21-OH tornou-se possível a partir de 1977, quando Pang *et al.* descreveram uma técnica de ensaio para a dosagem da 17-OHP a partir do sangue de recém-nascidos colhido em papel-filtro<sup>4</sup>.

O primeiro programa mundial de triagem para HAC foi introduzido no Alasca, pois a incidência dessa doença é excepcionalmente elevada entre os esquimós Yupik. Os resultados mostraram incidência de indivíduos com a forma perdedora de sal ainda mais alta que a esperada, passando de 1:490 para 1:282 após a triagem<sup>5</sup>. Subsequentemente, vários programas foram iniciados na França, Suécia, Suíça, Nova Zelândia, Áustria,

Holanda, Japão, assim como em outros países. Nos Estados Unidos da América (EUA), a triagem para HAC foi introduzida em 1987 e, atualmente, todos os 50 estados norte-americanos realizam rotineiramente essa investigação. A triagem também é feita em algumas regiões do Canadá, Itália, Espanha, Alemanha, Argentina e, no Brasil, está implantada como rotina apenas nos estados de Santa Catarina e Goiás<sup>7,8,22-24</sup>.

Mais de 30 milhões de recém-nascidos em todo o mundo já foram triados para HAC e estudos comparativos entre o período anterior e posterior à triagem mostraram benefícios evidentes<sup>25-27</sup>.

A incidência da doença varia de acordo com a etnia e a área geográfica. Em 1993, Pang *et al.* coletaram dados dos programas de triagem neonatal para HAC realizados em 29 países. A incidência mundial para a forma clássica da doença a partir dos dados de 6,5 milhões de recém-nascidos submetidos à triagem foi de 1:15.000 nascidos vivos. Variou de 1:10.000 a 1:14.000 nos países da Europa, exceto na Escócia e Espanha com valores mais baixos e de 1:15.000 a 1:16.000 na América do Norte, chegando a 1:280 entre os esquimós Yupik do Alasca e 1:2.100 na ilha francesa La Réunion, no Oceano Índico (duas populações geograficamente isoladas)<sup>1</sup>. Altas taxas também foram relatadas no Brasil (1:7.500) e nas Filipinas (1:7.000)<sup>28</sup>. Em Goiás, foi registrada incidência de 1:10.325, inferior à encontrada anteriormente no sul do Brasil<sup>8</sup>.

Como a triagem neonatal é realizada entre o terceiro e o quinto dias de vida do recém-nascido, detectando com alta sensibilidade apenas a forma perdedora de sal da doença<sup>24</sup>, foi proposto que a real incidência da forma clássica seja ainda maior.<sup>29</sup>

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), implantado com a Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 822 de 06/06/2001, recomenda a realização da triagem neonatal para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias e fibrose cística. A Portaria MS nº 822 também considera a necessidade de definir e ampliar a gama de doenças congênitas a serem prioritariamente incluídas no programa, desde que levem em conta, entre outros aspectos, a sua frequência na população, a possibilidade de tratamento e os benefícios gerados à saúde pública<sup>30</sup>.

As doenças incluídas nos programas de triagem neonatal variam muito entre países e diversas regiões do mundo. Os critérios habitualmente usados para que uma doença seja incluída nesses programas seguem aqueles propostos por Wilson e Jungner, publicados pela Organização Mundial de Saúde em 1968<sup>31</sup>(ANEXO A). Doenças consideradas apropriadas para triagem neonatal devem ser relativamente frequentes na população triada,

apresentar morbidade e mortalidade significativas quando não tratadas precocemente e ter resposta benéfica ao tratamento<sup>2,31,32</sup>.

A HAC é uma doença com incidência semelhante à da fenilcetonúria, para a qual os programas de triagem foram inicialmente criados. Envolve risco de morte para as crianças acometidas, especialmente do sexo masculino, sendo o tratamento baseado na reposição de glicocorticóide e mineralocorticóide. A administração de glicocorticóide (acetato de hidrocortisona) suprime o ACTH, com diminuição nos níveis séricos de 17-OHP e andrógenos. A reposição de mineralocorticóide utilizando a fludrocortisona (Florinefe®) é necessária nos pacientes com a forma clássica perdedora de sal. A deficiência concomitante de cortisol e aldosterona pode levar à desidratação hiponatrêmica e choque em pacientes não tratados. O tratamento adequado restaura e garante a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da glicemia e previne os efeitos relacionados ao hiperandrogenismo<sup>33</sup>. A HAC preenche, portanto, os critérios para inclusão em programas de triagem.

Os principais objetivos da triagem para HAC são: a) detectar os casos graves da doença (perdedores de sal) para prevenção de choque, dano cerebral e morte por meio de tratamento pré-sintomático; b) impedir ou reduzir o tempo de registro civil incorreto que pode ocorrer em meninas afetadas virilizadas<sup>34,35</sup>.

Se a triagem neonatal não é realizada e se não há relato de história familiar positiva, todos os meninos e uma parcela de meninas não são diagnosticados até a ocorrência de crise adrenal<sup>26,27</sup>. A HAC é doença autossômica recessiva e, portanto, é esperada distribuição semelhante entre os sexos, ao nascimento. Tem sido observado que quando a triagem não é realizada, mais crianças do sexo feminino são diagnosticadas (4:1), o que constitui forte evidência de mortes não reconhecidas, por HAC, entre crianças do sexo masculino<sup>2,36</sup>.

A triagem neonatal para HAC também reduz a morbidade da doença por várias razões. Já está bem estabelecido que ela diminui significativamente a idade ao diagnóstico da doença<sup>24,25,37</sup>. Recém-nascidos diagnosticados pela triagem apresentam hiponatremia menos importante do que os não triados (média do sódio ao diagnóstico de 134 mmol/L *versus* 124 mmol/L, respectivamente) e tendem a ser hospitalizados por períodos de tempo mais curtos<sup>3,25,38</sup>. Além dos riscos de curto prazo, as crises adrenais podem levar também a consequências em longo prazo. Dificuldades de aprendizado têm sido relatadas em pacientes que apresentaram crises de perda de sal<sup>39,40</sup>, entretanto, ainda não se sabe se a realização da triagem neonatal reduz a frequência e a gravidade dessas alterações.



Benefícios adicionais da triagem incluem redução da virilização, tanto em meninas quanto em meninos, e de suas consequências<sup>41</sup>. Meninos não triados com a forma clássica virilizante simples podem não ser diagnosticados até que ocorra aceleração do crescimento e da idade óssea, com consequente perda de estatura final. Entretanto, é contestável se esse benefício, por si só, justifica os custos da triagem<sup>32</sup>. A triagem neonatal para HAC também não possui como objetivo a detecção da forma não clássica ou tardia da doença.

A 17-OHP elevada em sangue colhido em papel-filtro é utilizada para indicar pacientes com risco de apresentar HAC. Várias técnicas para medida da 17-OHP estão disponíveis e incluem radioimunoensaio (RIA), testes imunoenzimáticos - *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) e testes imunofluorimétricos (FIA). O radioimunoensaio foi o primeiro método desenvolvido, mas, como o ELISA, tem sido quase que completamente substituído pelo método imunofluorimétrico *dissociation-enhanced, lanthanide fluorescence immunoassay* (DELFIAR<sup>®</sup>), que é altamente automatizado<sup>42</sup>.

Todos os métodos imunológicos superestimam os níveis de 17-OHP devido à especificidade insuficiente dos anticorpos utilizados e, especialmente em neonatos, devido à reação cruzada com hormônios produzidos pela adrenal fetal<sup>43</sup>.

O córtex da glândula adrenal fetal possui duas zonas morfológica e funcionalmente distintas: uma externa, compacta, chamada de “definitiva”; e uma zona mais larga, central, a zona “fetal”. A zona definitiva é responsável pela maior parte da produção de glico e mineralocorticoide no feto, enquanto a zona fetal é relativamente deficiente em 3 $\beta$ -HSD tipo 2 e rica em 17,20-liase. Com isso, há grande produção de DHEA e sulfato de DHEA, precursores androgênicos utilizados para a síntese placentária de estrogênios<sup>44</sup>. Após o nascimento, verifica-se o remodelamento da glândula adrenal, com atrofia progressiva da zona fetal. Apesar disso, grandes quantidades de esteroides sulfatados, incluindo o sulfato de 17-OH pregnenolona, ainda são encontradas no plasma do recém-nascido. Esses esteroides sulfatados, estruturalmente semelhantes à 17-OHP, são os responsáveis pelas reações cruzadas.

O sulfato de 17-OH pregnenolona é relatado como o composto de maior interferência nos radioimunoensaios<sup>45,46</sup>. As reações cruzadas com o método imunofluorimétrico são muito menores quando comparadas com o RIA, ocorrendo principalmente com a progesterona (3,6%) e muito menos com a 17-OH pregnenolona (0,13%). Os *kits* que reagem 5% ou mais com esses esteroides devem ser evitados<sup>47</sup>.

Há acentuada variação em relação aos pontos de corte da 17-OHP de um programa para o outro<sup>48</sup>. Isso é devido aos diferentes anticorpos e reagentes empregados, à variação

na espessura e densidade do papel-filtro e, mais significativamente, às características da população de referência (em termos de peso ao nascer e idade gestacional). Pontos de corte que diferenciam resultados positivos de negativos nos testes de triagem têm sido estabelecidos acima do percentil 99 para recém-nascidos saudáveis<sup>2,49</sup>.

A alta taxa de reconvocação, especialmente de prematuros, é um grave problema na triagem neonatal para HAC. Sem medidas específicas, as taxas de reconvocação foram estimadas entre 1 e 3%<sup>50</sup>.

Os falso-positivos são observados principalmente entre prematuros, recém-nascidos com baixo peso ao nascimento e estressados (doentes). Geralmente esses casos apresentam níveis moderados de 17-OHP, similares aos dos recém-nascidos afetados pela forma virilizante simples ou pela forma não clássica da doença<sup>51,52</sup>.

Em estudo com crianças prematuras onde foram avaliados os níveis de 17-OHP, 17-OH pregnenolona, 11-deoxicortisol e cortisol basais e após estímulo com ACTH<sup>53</sup>, as concentrações basais de cortisol não foram significativamente diferentes das dos recém-nascidos a termo, mas os outros três foram todos significativamente mais altos. Os resultados encontrados foram consistentes com diminuída atividade da enzima 11 $\beta$ -hidroxilase, o que já tinha sido sugerido anteriormente também por outros autores<sup>54</sup>. Outra evidência desse achado é que os elevados níveis de 17-OHP em recém-nascidos prematuros têm sido confirmados por cromatografia líquida de alta performance, não podendo ser, portanto, atribuídos somente à reação cruzada com outros esteroides. O perfil de esteroides encontrado nessas crianças sugere deficiência funcional de enzimas esteroidogênicas, com nadir de função na 29ª semana de gestação<sup>55,56</sup>. Outro fator seria a elevação dos níveis de ACTH secundária ao estresse, levando a aumentos reais da 17-OHP. A imaturidade renal, encontrada principalmente nos prematuros, com diminuição da excreção dos metabólitos da 17-OHP, também contribuiria para o aumento da taxa de falso-positivos nesse grupo<sup>57,58</sup>.

Os níveis de 17-OHP são normalmente altos ao nascimento e caem rapidamente nos primeiros dias de vida pós-natal e, pelo contrário, aumentam com o tempo quando o recém-nascido é afetado pela doença<sup>52,59</sup>.

Devido ao elevado número de casos falso-positivos, o valor preditivo positivo (VPP) do teste para HAC é muito baixo - aproximadamente 1%. O VPP pode ser melhorado utilizando-se ponto de corte mais alto para a 17-OHP do que aquele rotineiramente utilizado, mas com risco de perda de sensibilidade. Essa decisão vai depender, em parte, dos objetivos dos programas de triagem. A utilização de pontos de

corte relativamente altos pode detectar eficientemente os recém-nascidos com a forma grave, perdedora de sal da doença (aqueles que possuem os níveis mais altos de 17-OHP), mas pode perder alguns casos virilizantes simples<sup>24,60</sup>. Como o principal objetivo da triagem é a detecção precoce das crianças com a forma perdedora de sal, o atraso no diagnóstico dos pacientes virilizantes simples pode ser considerado aceitável se os custos do programa são baixos.

Tem sido demonstrado que o ajuste dos pontos de corte da 17-OHP para idade gestacional ou peso ao nascimento pode diminuir a taxa de reconvocação, melhorando o VPP<sup>50,61</sup>. Mas apesar desses ajustes, a taxa de resultados falso-positivos ainda é de aproximadamente 1%<sup>52</sup>.

Nos EUA, Canadá e Nova Zelândia, os pontos de corte da 17-OHP são baseados no peso ao nascimento, enquanto que em outros países são baseados na idade gestacional. Estudo demonstrou que os níveis de 17-OHP correlacionam-se muito melhor com a idade gestacional do que com o peso ao nascimento<sup>62</sup>, apesar da determinação da idade gestacional ser menos confiável e, portanto, menos viável de ser utilizada. Os autores concluíram que os pontos de corte baseados na idade gestacional resultaram em mais sensibilidade e especificidade. Uma explicação para esse achado pode ser o fato de a idade gestacional estar mais relacionada ao desenvolvimento das glândulas adrenais, ou seja, baixo peso ao nascimento, por si só, não prediz níveis elevados de 17-OHP. Na Holanda, a adoção de pontos de corte de acordo com a idade gestacional melhorou o VPP dos testes para HAC de 4,5% para 16%<sup>3</sup>.

A especificidade dos métodos imunológicos pode ser melhorada por uma etapa de extração orgânica para remover substâncias interferentes, incluindo sulfatos de esteroides. Estudo recente constatou redução de 40% na taxa de falso-positivos quando foi realizada extração com éter dietílico antes da dosagem da 17-OHP pelo método DELFIA®, em papel-filtro<sup>63</sup>.

Pesquisa demonstrou que a dosagem adicional do cortisol, na mesma amostra em papel-filtro, ajudou a descartar a HAC em alguns casos de elevação da 17-OHP secundária ao estresse. Entretanto, a medida não se mostrou confiável para ser utilizada como rotina, já que houve sobreposição dos valores de cortisol entre crianças normais e doentes<sup>64</sup>.

Estratégias diferentes, como a implantação de uma segunda etapa na triagem utilizando testes mais específicos, têm sido tentadas. Abordagem genética<sup>65,66</sup> ou bioquímica<sup>67</sup> já foram propostas para exames de segunda etapa, mas nenhuma ainda foi implementada em larga escala.

A análise molecular como exame de segunda etapa traz a possibilidade de redução da taxa de falso-positivos para próximo de zero, mas o custo elevado, o problema da detecção de heterozigotos e a necessidade de aconselhamento genético são as principais razões que impedem a sua implantação<sup>63</sup>.

Em relação à análise bioquímica, mais especificidade tem sido conseguida pela espectrometria de massa (EM) associada à cromatografia gasosa (CG) ou à cromatografia líquida (CL). Wudy *et al.*, no intuito de minimizar os resultados falso-positivos, desenvolveram um método para análise da 17-OHP, androstenediona e testosterona no plasma, utilizando a CG-EM<sup>68</sup>. Entretanto, o tempo gasto para as fases pré-analítica e analítica impede o seu uso como um método de triagem universal. Subsequentemente, uma técnica baseada na cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em *tandem* (CL-EMEM) foi desenvolvida para dosagem da 17-OHP plasmática<sup>69</sup>. A CL-EMEM possui a vantagem das amostras poderem ser facilmente processadas e do tempo para análise ser significativamente mais curto do que a CG-EM. Mais recentemente, a dosagem da 17-OHP por CL-EMEM em amostras de sangue seco foi publicada, permitindo sua aplicação na triagem neonatal<sup>70</sup>.

Apesar desses avanços metodológicos, os problemas com os resultados falso-positivos em recém-nascidos prematuros ou estressados não podem ser completamente superados com a determinação isolada da 17-OHP. O problema da reação cruzada com os esteroides fica resolvido, mas as dificuldades em relação à atividade diminuída da 11 $\beta$ -hidroxilase nos prematuros e à elevação do ACTH nos estressados apenas podem ser superadas com o uso de perfis de esteroides. A razão para a utilização desses perfis é justificada pelo fenótipo bioquímico da HAC ser caracterizado por níveis elevados não só de 17-OHP, mas também de outros esteroides como a androstenediona, enquanto o cortisol é relativamente baixo. Lacey e Minutti foram os primeiros a avaliar o perfil de esteroides em recém-nascidos com triagem positiva, utilizando 17-OHP, androstenediona e cortisol<sup>71,72</sup>. O método utilizou dois pontos de corte, incluindo um para a 17-OHP e o outro para a soma da 17-OHP e androstenediona dividida pelo cortisol. Os autores foram capazes de identificar 89% das amostras falso-positivas, melhorando o VPP de 0,5 para 4,7%. A única limitação para o método foi o tempo de análise de 12 minutos, o que não seria adequado para teste de triagem universal. Quando essa mesma estratégia foi utilizada como exame de segunda etapa em um laboratório de Minnesota por três anos (204.000 nascimentos), o VPP da doença aumentou para 7,3%<sup>73</sup>. Janzen *et al.* aperfeiçoaram ainda mais essa técnica adicionando a dosagem de 21-deoxicortisol ao perfil de esteroides<sup>67</sup>. O

21-deoxicortisol (produzido pela 11 $\beta$ -hidroxilação da 17-OHP) não é normalmente produzido em grande quantidade em prematuros e, portanto, níveis elevados desse esteroide são altamente específicos para a deficiência da 21-hidroxilase<sup>32</sup>. Os autores realizaram, em 1.609 amostras inicialmente positivas, as razões entre 21-deoxicortisol e cortisol, 17-OHP e cortisol e a soma de 21-deoxicortisol e 17-OHP pelo cortisol. Todas as 16 crianças doentes foram identificadas corretamente e não houve casos falso-positivos (sensibilidade, especificidade e VPP de 100%).

Os custos associados aos resultados falso-positivos são elevados. Qualquer resultado anormal demanda o acompanhamento, para que nenhuma criança afetada seja perdida. O acompanhamento dessas crianças deve ser realizado até que se obtenha definição diagnóstica ou até a normalização dos níveis séricos de 17-OHP, não apenas aumentando os custos econômicos dos programas de triagem, mas também causando muita ansiedade nos pais<sup>74</sup>. Apesar disso, os custos da triagem para HAC têm sido considerados aceitáveis<sup>75</sup>.

Um programa de triagem neonatal é exequível dependendo das taxas de falso-positivo (especificidade) e de falso-negativo (sensibilidade) encontradas<sup>2</sup>. Não há consenso em relação à porcentagem de casos falso-positivos que seria aceitável, mas estes são mais aceitáveis que os falso-negativos<sup>73</sup>.

Em relação à sensibilidade da triagem neonatal para HAC, estudos têm relatado que todos os casos de crianças com a forma perdedora de sal são detectados pela análise dos níveis de 17-OHP em papel-filtro, mas até um terço dos casos virilizantes simples têm sido perdidos se uma única amostra é colhida logo após o nascimento<sup>60,76</sup>. A maioria dos casos virilizantes simples pode ser detectada se uma segunda amostra é realizada com duas semanas de vida, o que justificou a sua implantação no programa de triagem do Texas. Essa abordagem, entretanto, aumenta a detecção de casos não clássicos da doença, o que não representa um objetivo da triagem<sup>24</sup>.

Múltiplos cursos de corticoide administrados à mãe com risco de parto prematuro podem reduzir os níveis de 17-OHP do recém-nascido e, portanto, aumentar a chance de falso-negativo no resultado da triagem. Como têm sido observados resultados inconsistentes em relação à administração antenatal de corticosteroides, na prática<sup>77-79</sup>, todos os recém-nascidos cujas mães receberam esse tratamento e foram triados para HAC ao nascimento devem ser retestados após vários dias de vida. O uso de esteroides pela mãe, entretanto, não parece influenciar os valores de 17-OHP, a não ser que a amostra tenha sido coletada durante as primeiras 48 horas de vida do recém-nascido<sup>23</sup>.

Além disso, recém-nascidos do sexo feminino possuem níveis médios de 17-OHP mais baixos que recém-nascidos do sexo masculino, o que reduz um pouco a sensibilidade da triagem em meninas. Essa diferença entretanto, não é grande problema na prática, já que a maioria das meninas com a forma clássica da doença é diagnosticada devido à genitália ambígua ao nascimento<sup>76</sup>.

Vários países têm relatado experiências positivas após implantação da triagem neonatal para HAC.

Na Holanda, estudo-piloto com duração de dois anos (1998-2000) realizou a triagem de 176.684 recém-nascidos e detectou 15 crianças com HAC (sete meninos). Seis dos sete meninos e três das oito meninas foram detectadas primariamente pela triagem, antes da ocorrência de crise de perda de sal. No mesmo período, um estudo foi realizado nas demais regiões do país que não participaram do projeto-piloto. Nessas regiões, ocorreram 223.307 nascimentos e 19 pacientes foram diagnosticados clinicamente com a doença (10 meninos). A maioria dos meninos foi admitida em crise grave de perda de sal com hiponatremia importante. No primeiro ano da pesquisa, a taxa de casos falso-positivos encontrada foi de 0,24%, sendo que 70% eram prematuros. Já no segundo ano, com a utilização de pontos de corte baseados na idade gestacional, a taxa de falso-positivos passou para 0,03%, sem relatos de casos falso-negativos. Esse estudo demonstrou que não apenas os meninos se beneficiam da triagem, já que a doença não foi reconhecida clinicamente em algumas meninas. Também demonstrou que as crises graves de perda de sal podem ser prevenidas. Baseado nos resultados desse projeto-piloto, a triagem neonatal para HAC foi implantada em toda a Holanda no ano de 2000<sup>3</sup>.

Estudo na Alemanha utilizando dados da triagem para HAC realizada entre 1999 e 2002 (538.466 recém-nascidos triados) revelou incidência da forma clássica da doença de 1:11.218 (intervalo de 95% de confiança – 1:8.461 a 1:15.215). A taxa total de reconvocação foi de 0,74% e o VPP de 1,29%, com a adoção de pontos de corte para cinco categorias de peso e para a idade à coleta<sup>50</sup>.

Após 33 meses de triagem neonatal para HAC no nordeste da Itália, entre setembro de 2001 e maio de 2004 (oito meses utilizando ponto de corte único e 25 meses usando ponto de corte ajustado para a idade gestacional), foram triadas 128.282 crianças, com incidência da doença de 1:21.380. Em cinco das seis crianças afetadas o diagnóstico foi estabelecido apenas após o resultado da triagem, sendo eficaz na prevenção das crises de perda de sal. O ajuste dos pontos de corte baseado na idade gestacional permitiu

significativa redução no número de casos falso-positivos entre as crianças prematuras, com redução na taxa de reconvocação entre essas crianças de 2,59 para 0,83%<sup>34</sup>.

Pesquisa na Austrália, publicada em 2008, comparou dados de população triada *versus* não triada. Não houve diferença na incidência da doença e na taxa M:F dos doentes entre as duas populações, mas a triagem possibilitou claramente o diagnóstico precoce e a prevenção das crises de perda de sal na população triada<sup>80</sup>.

Os resultados da triagem neonatal para HAC em alguns países estão resumidos no QUADRO 1.

### QUADRO 1

Resumo da triagem neonatal para HAC em alguns países europeus

País	Número de triados	Incidência da doença	Intervalo de confiança de 95%	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	VPP (%)
<b>Bélgica</b> <sup>81</sup>	206.108	1:25.000	59.741-13.078	99,1	100	0,43
<b>Suíça</b> <sup>82</sup>	89.129	1:12.733	31.718-6.181	99,81	100	4,1
<b>França</b> <sup>83</sup>	408.138	1:11.661	17.178-8.680	99,62	97	2,1
<b>Itália</b> <sup>*84</sup>	128.330	1:11.666	23.375-6.521	99,66	91	2,3
<b>Suécia</b> <sup>85</sup>	557.410	1:11.612	16.082-8.874	99,96	92	24
<b>Holanda</b> <sup>3</sup>	176.684	1:11.778	16.835-8.507	99,86	100	6,0

\* Entre 1991 e 1995.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o programa de triagem neonatal para HAC implantado no estado de Minas Gerais, como projeto-piloto, entre setembro de 2007 e maio de 2008.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a incidência da doença nessa população.
- Descrever as características clínico-laboratoriais das crianças doentes.
- Avaliar a eficácia do programa em detectar precocemente os casos perdedores de sal e impedir o registro civil incorreto de meninas.
- Avaliar a eficácia dos níveis de 17-OHP em discriminar indivíduos normais de doentes.
- Determinar a ocorrência de falso-positivos e falso-negativos e avaliar a evolução dessas crianças.
- Avaliar a viabilidade da implantação de um programa de triagem neonatal para HAC no sistema público de saúde do estado.



## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

A casuística incluiu todas as crianças submetidas à triagem neonatal pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG) entre 1º/09/2007 e 1º/05/2008, época em que foi instituído o projeto-piloto de triagem para HAC. Foram triadas 159.415 crianças, correspondendo à quase totalidade das nascidas nesse período no estado, já que o programa possui ampla cobertura populacional.

### **4.2 Métodos**

Trata-se de um estudo retrospectivo no qual foram analisados dados clínico-laboratoriais referentes às crianças submetidas ao projeto-piloto de triagem neonatal para HAC no estado de Minas Gerais. O dados foram obtidos no Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (NUPAD).

#### **4.2.1 O projeto-piloto**

O projeto-piloto de triagem neonatal para HAC foi incluído no Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG). O PETN-MG foi implantado em setembro de 1993 pelo NUPAD, em convênio com a Secretaria de Estado da Saúde. Atualmente, é o centro de referência em triagem neonatal no estado, após seu credenciamento pelo Ministério da Saúde em 2001. O PETN-MG realiza rotineiramente a triagem neonatal para quatro doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias e fibrose cística, com cobertura de 100% dos municípios de Minas Gerais. A coleta de sangue para o teste de triagem é realizada em papel-filtro, idealmente no quinto dia de vida da criança, por meio de punção do calcanhar do recém-nascido. As amostras são coletadas nas unidades básicas de saúde ou nas maternidades (quando o recém-nascido permanece retido) e enviadas pelo correio ao NUPAD, onde são

processadas. Qualquer amostra positiva desencadeia um processo de busca ativa da criança. Por contato telefônico realizado pelo NUPAD, a criança é convocada com urgência para nova coleta ou para consulta médica, conforme o protocolo específico de cada doença.

A triagem para HAC foi realizada por meio de dosagem da 17-OHP em papel-filtro (S&S 903<sup>®</sup>) na mesma amostra utilizada para a triagem de rotina do PETN-MG. A dosagem foi realizada pelo método ELISA, utilizando-se o ensaio UMELISA 17-OH Progesterona NEONATAL<sup>®</sup> (Centro de Imunoensaio, Havana, Cuba) com o valor de referência para a normalidade de até 55 nmol/L.

Trata-se de um ensaio imunoenzimático competitivo no qual o antígeno natural (17-OHP) e o antígeno marcado com uma enzima (17-OHP/fosfatase alcalina) competem por limitada quantidade de sítios de ligação com os anticorpos. O ensaio utiliza como fase sólida placas de ultramicro ELISA revestidas previamente com anticorpos policlonais anti-17-OHP de coelho. As amostras em sangue seco são eluídas com solução que contém o conjugado 17-OHP/fosfatase alcalina. Esse eluato é depositado nas cavidades das tiras, para permitir a formação do complexo anticorpo-17-OHP-enzima. A realização de um lavado posterior elimina os componentes não fixados. Ao adicionar o substrato fluorogênico (4-metilumbeliferil fosfato) nas cavidades das tiras, este será hidrolisado pela enzima do conjugado e a intensidade da fluorescência emitida será inversamente proporcional à concentração de 17-OHP presente na amostra. A variação intraensaio relatada pelo fabricante do *kit* foi de 5,5 a 8,2% (n=10) e a variação interensaio de 6,4 a 9,1% (n=20), em altas e baixas concentrações, respectivamente. Os níveis de reação cruzada com outros compostos, relatados pelo fabricante, estavam dentro dos valores aceitáveis para este ensaio: 17-OH pregnenolona - 4,5%, progesterona - 0,13% e cortisona - < 0,1%. Os resultados foram expressos em nmol/L de sangue (fator de conversão: nmol/L de sangue = 0,73 ng/mL de soro). As amostras foram avaliadas em duplicata.

Após análise preliminar das primeiras 15.000 amostras, estabeleceu-se o percentil 99 da 17-OHP (82,21 nmol/L), adequando-se o ponto de corte à população estudada. O valor de 80 nmol/L passou, então, a ser adotado como limite de normalidade. As crianças com valores de 17-OHP acima de 160 nmol/L na primeira amostra em papel-filtro eram convocadas com urgência para consulta médica. As crianças com valores de 17-OHP entre 80 e 160 nmol/L eram convocadas para nova coleta em papel-filtro. Se a segunda amostra confirmasse resultado > 80 nmol/L, a criança era imediatamente convocada para consulta

médica. A triagem foi considerada positiva, no grupo de crianças convocadas para consulta médica.

A partir de 29/11/2007 foi adotado um ponto de corte específico para crianças retidas nas maternidades. Os recém-nascidos classificados como baixo peso (<2.500 g) ou prematuros (<37 semanas) tiveram novo ponto de corte: 160 nmol/L passou a ser considerado o limite de normalidade para essas crianças. A partir dessa data foi solicitada a informação do peso das crianças no cartão de triagem.

A avaliação clínica das crianças convocadas para consulta médica foi feita no ambulatório São Vicente (anexo do Hospital das Clínicas da UFMG), por endocrinologistas pediátricos. Exames séricos confirmatórios (17-OHP, androstenediona e testosterona) e ionograma (Na e K) eram realizados em todas as crianças no dia da primeira consulta. A dosagem da 17-OHP sérica foi realizada pelo método de radioimunoensaio; e da androstenediona e testosterona pelo método de quimioluminescência, em laboratório de referência conveniado, com valores de referência conforme os QUADROS 2, 3 e 4.

#### QUADRO 2

Valores de referência da 17-OHP sérica

<b>Faixa Etária</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>
<b>Menor que 1 mês</b>	53 A 186 ng/dL	17 A 204 ng/dL
<b>1 a 6 meses</b>	35 A 157 ng/dL	25 A 110 ng/dL
<b>6 a 12 meses</b>	6 A 40 ng/dL	5 A 47 ng/dL
<b>Pré-púbere</b>	1 A 82 ng/dL	2 A 72 ng/dL

Método: Radioimunoensaio.

#### QUADRO 3

Valores de referência da androstenediona sérica

<b>Faixa Etária</b>	<b>Ambos os sexos</b>
<b>Pré-púbere</b>	<1,6 ng/mL

Método: Quimioluminescência.

## QUADRO 4

Valores de referência da testosterona sérica

<b>Faixa Etária</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>
<b>Prematuro</b>	0,37-1,98 ng/mL	0,05-0,22 ng/mL
<b>Recém-nascido</b>	0,75-4,0 ng/mL	0,20-0,64 ng/mL
<b>Pré-pubere</b>	0,02-0,30 ng/mL	0,01-0,20 ng/mL

Método: Quimioluminescência.

O resultado do ionograma estava disponível para o médico à primeira consulta, com os seguintes valores de referência: Na: 134-146 mmol/L e K: 3,7-5,9 mmol/L.

As crianças com triagem neonatal positiva, exames séricos confirmatórios elevados (17-OHP, androstenediona e testosterona) e clínica sugestiva (virilização em meninas ou evidência de perda de sal em ambos os sexos) ou ionograma alterado, receberam o diagnóstico de HAC por D21-OH.

Foram considerados casos indeterminados aqueles com triagem neonatal positiva, exames confirmatórios alterados, ionograma normal e ausência de sinais clínicos de doença.

As crianças doentes e os casos indeterminados foram acompanhados clinicamente e por meio da dosagem sérica de 17-OHP e androstenediona, regularmente.

Tratamento com glicocorticoide (acetato de hidrocortisona - 10 mg/m<sup>2</sup>/dia) e mineralocorticoide (fludrocortisona - 0,1 mg/dia) foi instituído nas crianças com doença confirmada.

A partir de outubro de 2008 iniciou-se o processo de descentralização do atendimento e as crianças do interior de Minas Gerais passaram a ser acompanhadas por médico treinado, no próprio município de origem.

Os casos indeterminados foram acompanhados até a normalização dos níveis séricos de 17-OHP, quando, então, receberam alta do programa e foram classificados como falso-positivos. Algumas crianças ainda estão em acompanhamento e vêm apresentando queda gradativa nos níveis de esteroides séricos, mesmo sem tratamento. Essas crianças foram incluídas no grupo de falso-positivos para fins de análise.

O fluxograma do programa-piloto está apresentado a seguir, na FIG. 2.

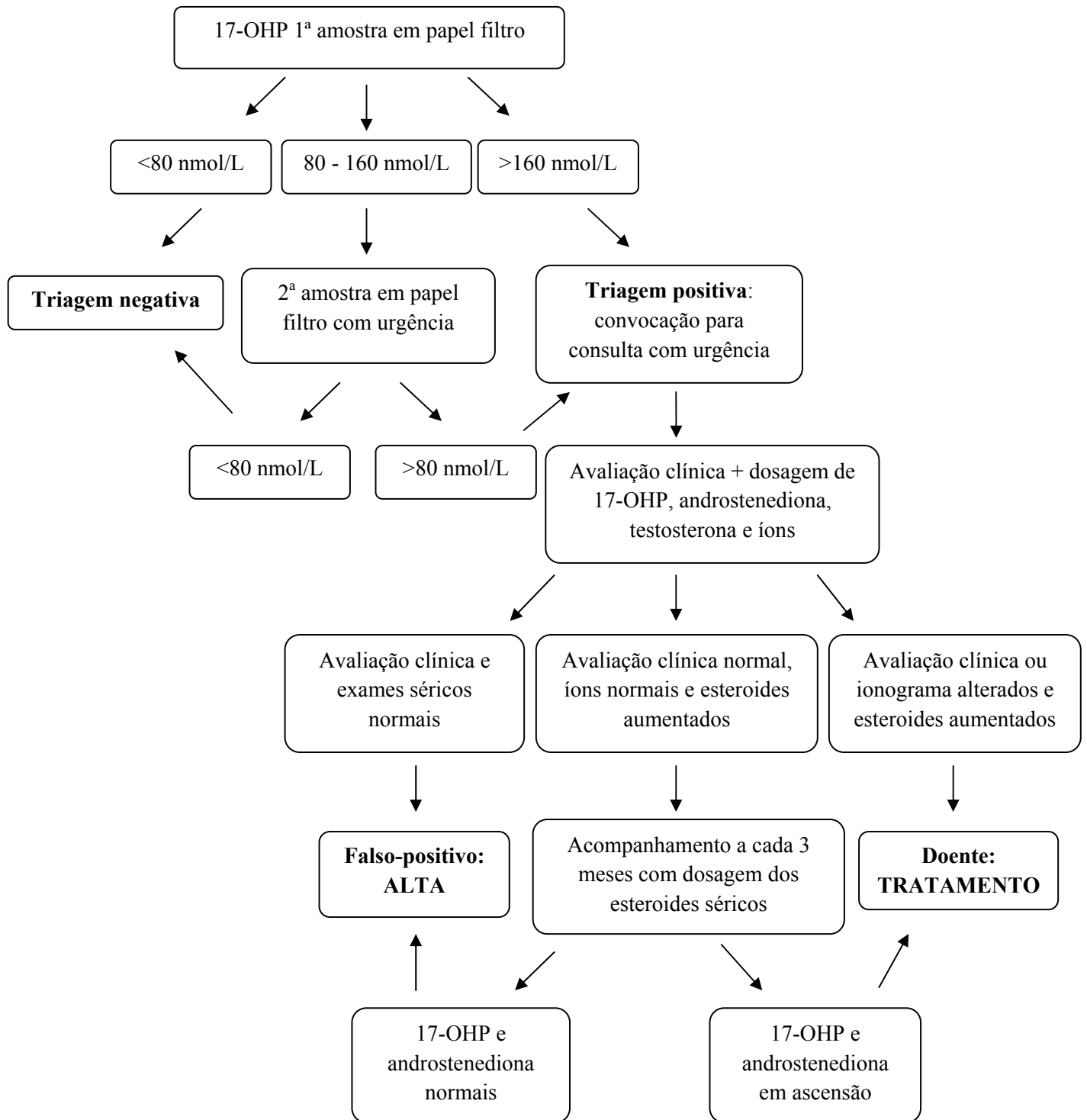


FIGURA 2 - Fluxograma da triagem neonatal para HAC - PETN-MG.

Análise molecular do gene CYP21A2 foi realizada em todas as crianças convocadas para consulta médica até o dia 08/10/2007, quando foi suspensa. Foram analisadas 51 crianças falso-positivas acompanhadas pelo PETN-MG. Realizou-se a PCR com sistemas de *primers* alelo-específicos (ASO-PCR) para estudo das seguintes

mutações: P30L, I2 *splice*, Del 8bp, I172N, Cluster exon 6, V281L, Q318X e R356W do gene CYP21A2, responsáveis pela HAC por deficiência da 21-hidroxilase.

O painel de mutações estudado é composto de oito mutações de ponto do gene CYP21A2, incluindo as cinco mais frequentes na população brasileira<sup>86</sup>.

#### 4.2.2 Análise dos dados

Os dados do projeto-piloto de triagem neonatal para HAC foram fornecidos pelo NUPAD e analisados retrospectivamente. Primeiramente, foi calculada a incidência da doença no estado, levando-se em consideração o número de casos diagnosticados em relação ao número total de crianças triadas. Foi feita análise descritiva das crianças doentes em relação às seguintes variáveis: dados antropométricos, idade gestacional, história familiar, idade à coleta da triagem, idade e apresentação ao diagnóstico, forma clínica da doença e níveis hormonais, conforme ficha própria de atendimento (APÊNDICE A).

A análise de todos os outros dados da triagem foi relativa aos primeiros seis meses do projeto-piloto (período de 1º/09/2007 a 26/02/2008), já que a partir do dia 27/02/2008 ocorreu mudança no lote do *kit* UMELISA 17-OH Progesterona NEONATAL®, sendo notada representativa diferença na especificidade do teste.

Foi procedida análise descritiva de todas as ocorrências na triagem nesse período (número de crianças com primeira amostra alterada, número de crianças convocadas para segunda amostra, número de crianças convocadas para consulta e número de perdas, incluindo óbitos). Foram calculadas as taxas de reconvocação e de falso-positivos. A taxa de reconvocação foi calculada levando-se em consideração todas as crianças convocadas para coleta de nova amostra ou para consulta médica. Foram determinados especificidade, sensibilidade e VPP do teste.

Os casos falso-positivos foram estudados quanto à antropometria, idade gestacional, história familiar, intercorrências perinatais, tempo de acompanhamento e exames laboratoriais e genéticos (APÊNDICE A). Os níveis dos esteroides adrenais foram comparados entre crianças falso-positivas e doentes.

A distribuição dos níveis de 17-OHP na população triada foi investigada. As crianças triadas que apresentavam informação do peso ao nascimento (13.298 crianças) foram distribuídas em quatro grupos de peso ((1)  $\geq 2.500$  g, n=10.222; (2) 2.000-2.499 g n=1357; (3) 1.500-1.999 g, n=971; (4)  $< 1.500$  g, n= 748) e os níveis de 17-OHP foram

analisados em cada grupo e comparados entre si. Os percentis 99 da 17-OHP foram obtidos para cada grupo.

A partir dos percentis 99 da 17-OHP obtidos, foram propostos novos pontos de corte para a triagem. A princípio, consideraram-se apenas dois pontos de corte (um para recém-nascidos com baixo peso ao nascimento e outro para recém-nascidos sem baixo peso ao nascimento). Posteriormente, quatro pontos de corte, de acordo com os quatro grupos de peso especificados, foram considerados. A taxa de falso-positivos e o VPP foram recalculados utilizando-se os novos pontos de corte.

#### 4.2.2.1 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 18.0. Inicialmente, foram avaliados quanto à distribuição normal. Como todos os dados investigados não mostraram distribuição normal, foram apresentados como medianas e analisados por testes não paramétricos.

O teste de Mann-Whitney foi empregado para comparar dois grupos independentes em relação à mediana. Pelo teste de Kruskal-Wallis foram comparados quatro grupos independentes em relação à mediana. Correção do nível de significância foi realizada para comparações múltiplas 2 a 2 (p/quantidade de grupos comparados).

O nível de significância utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG e da Prefeitura de Belo Horizonte (ANEXOS B e C). Os pais ou responsáveis, após informação, deram seu consentimento para inclusão da triagem para HAC nos testes de rotina.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Incidência da HAC

Entre setembro de 2007 e maio de 2008, 159.415 crianças foram triadas para HAC pelo PETN-MG. A idade à triagem foi, em média, de  $8 \pm 14$  dias, com mediana de seis dias.

Nesse período, 16 crianças iniciaram tratamento para HAC, verificando-se incidência, para a forma clássica da doença, de 1:9.963. Entretanto, em apenas oito crianças (cinco meninas) o diagnóstico de HAC foi confirmado e o tratamento mantido. As outras oito foram consideradas falso-positivas após seguimento clínico-laboratorial e mantiveram níveis normais de 17-OHP após a suspensão do tratamento.

A incidência da forma clássica da doença encontrada no estado de Minas Gerais, levando-se em consideração todo o período do projeto-piloto e o seguimento clínico-laboratorial das crianças por no mínimo dois anos e meio, foi de 1:19.927 com relação de meninos para meninas (M:F) de 1:1,6.

### 5.2 Caracterização das crianças doentes

As características das crianças doentes estão resumidas no QUADRO 5.

Das oito crianças que receberam o diagnóstico de HAC, seis (75%) foram classificadas como perdedoras de sal e duas como virilizantes simples. Em quatro meninas (casos 1, 3, 5 e 7) houve suspeita clínica da doença anteriormente ao resultado da triagem, já que foi notada genitália ambígua (prader II-IV) após o nascimento. Uma das meninas (caso 6) e todos os três meninos foram diagnosticados primariamente pela triagem neonatal. Não houve registro civil incorreto de nenhuma menina afetada.

A média de dias de vida das crianças doentes à realização da triagem foi de  $7 \pm 2$ . A média de dias de vida ao início do tratamento foi de  $104 \pm 194$ , com mediana de 39 dias (13-581). Uma menina com a forma virilizante simples e genitália Prader I compareceu à primeira consulta no programa com 49 dias de vida, mas iniciou tratamento apenas com 1 ano e 7 meses quando o diagnóstico da doença foi confirmado (caso 6). Essa criança



apresentou sinais de virilização progressiva (aumento de clitóris até 2 cm) e níveis de 17-OHP muito elevados (até 8.000 ng/dl) durante o acompanhamento.

Algumas crianças apresentaram hiponatremia e hipercalemia antes do início do tratamento, incluindo duas meninas com genitália ambígua, detectada após o nascimento. As médias do sódio e do potássio ao diagnóstico das crianças com a forma perdedora de sal foram de  $127 \pm 6$  mmol/L e  $7,0 \pm 0,8$  mmol/L, respectivamente. Três crianças iniciaram o tratamento com hidrocortisona venosa (casos 1, 4 e 8).

Todas as crianças doentes apresentaram níveis muito elevados de 17-OHP (superiores a 160 nmol/L), sendo convocadas diretamente para consulta médica. A mediana da 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro foi de 250 nmol/L (196-660).

A mediana da 17-OHP sérica confirmatória foi de 2.835 ng/dL (2.160-4.180). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de 17-OHP séricos entre crianças perdedoras de sal e virilizantes simples ( $p=0,43$ ). A mediana da androstenediona sérica foi de 32 ng/mL (0,3-310). A mediana da testosterona sérica foi de 1,3 ng/mL (0,3-6,0). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas da testosterona em ambos os sexos ( $p=0,83$ ).

Apenas uma criança doente era prematura (caso 6). Duas tinham história de consanguinidade entre os pais (casos 4 e 5). Nenhuma criança apresentava história familiar positiva para HAC. Uma possuía história familiar de óbito de um primo de três meses, atribuído à desnutrição (caso 4).

## QUADRO 5

### Resumo das principais características das crianças doentes

Caso	Sexo	IG	PN	Forma clínica / Prader	Idade à triagem (dias)	Idade ao diagnóstico (dias)	Suspeita clínica?	17-OHP papel-filtro (nmol/L)	17-OHP sérica (ng/dL)	Andros-tenediona (ng/mL)	Testoste-rona (ng/mL)	Eletrólitos	
												Na	K
1	F	41	3.620 g	PS/III	6	14	Sim	250	2.270	31	?	125	6,3
2	M	39	3.900 g	PS	9	45	Não	250	2.690	5,7	1,0	135	7,6
3	F	39	3.390 g	PS/III	7	23	Sim	660	3.630	0,3	6,0	120	7,1
4	M	40	4.000 g	PS	9	81	Não	213,43	2.880	32	1,2	129	7,9
5	F	37	2.515 g	PS/IV	5	13	Sim	660	3.680	0,3	0,3	131	5,9
6	F	36	2.500 g	VS/I	6	581	Não	196,17	4.180	38	?	133	5,9
7	F	38	2.900 g	VS/II	5	45	Sim	214,46	2.790	51	1,5	135	5,5
8	M	40	3.380 g	PS	8	32	Não	660	2.160	310	5,5	121	?

IG: Idade Gestacional; PN: Peso ao nascimento; F: Feminino; M: Masculino; PS: Forma perdedora de sal; VS: Forma virilizante simples; Na: Sódio; K: Potássio.

### **5.3 Análise da população triada no período de 1º/09/07 a 26/02/2008**

#### **5.3.1 Ocorrências na triagem**

No período entre setembro de 2007 e fevereiro de 2008, 106.476 crianças foram triadas para HAC. Desse total, 1.660 apresentaram valor de 17-OHP superior ao ponto de corte estabelecido na primeira amostra em papel-filtro.

De 13.298 crianças com peso ao nascimento informado, 3.207 (3% da população triada no período) nasceram prematuras ou com baixo peso. Entre essas 3.207, 354 apresentaram a primeira amostra alterada para HAC, quando foi utilizado o ponto de corte ajustado (160 nmol/L).

Na segunda amostra em papel-filtro, 1.136 crianças apresentaram valores de 17-OHP dentro da normalidade, recebendo alta.

Foram convocadas 380 crianças para consulta médica, sendo que sete foram consideradas doentes nesse período e estão em tratamento (seis no PETN-MG e uma em São Paulo, na UNICAMP). Uma criança doente era prematura.

Das 328 crianças consideradas falso-positivas, 315 foram acompanhadas no PETN-MG e 13 realizaram acompanhamento em outro serviço. Entre as nascidas a termo e sem baixo peso ao nascimento, apenas 24 tinham níveis de 17-OHP superiores a 160 nmol/L na 1ª amostra em papel-filtro.

Durante esse período, foram detectadas 189 perdas entre crianças com pelo menos uma amostra alterada, das quais 45 ocorreram entre as convocadas para consulta. Do total de perdas, 59 (31,2%) foram atribuídas a óbitos. A mais alta porcentagem desses óbitos (69%) foi referida entre crianças prematuras ou com baixo peso ao nascimento e nenhum deles foi atribuído à HAC. As outras causas de perdas foram atribuídas à falha no comparecimento ou criança não localizada (n=122), recusa dos pais a continuar no estudo (n=5) e perdas para outro serviço (n=3).

A TAB. 1 resume as ocorrências na triagem nesse período.

TABELA 1  
Resumo das ocorrências na triagem neonatal para HAC  
no período de 09/2007 a 02/2008

	<b>Total</b>
<b>Total de triados</b>	106.476
<b>Triagem alterada 1ª amostra (%)</b>	1660 (1,56)
<b>Convocados para nova amostra (%)</b>	1483 (1,4)
<b>Convocados diretamente para consulta (%)</b>	175 (0,16)
<b>Convocados para consulta após duas amostras alteradas (%)</b>	205 (0,2)
<b>Total de convocados para consulta (%)</b>	380 (0,36)
<b>Perdas de crianças convocadas para consulta</b>	45
<b>Doentes</b>	7
<b>Falso-positivos (%)</b>	328 (0,31)

A taxa de reconvocação geral foi de 1,56%.

A taxa de reconvocação entre as crianças com baixo peso ao nascimento ou prematuras, triadas pelo ponto de corte de 160 nmol/L, foi de 11%.

A taxa de falso-positivos encontrada foi de 0,31%. O valor preditivo positivo (VPP) do teste foi de 2,1%. O VPP entre crianças nascidas a termo, sem baixo peso ao nascimento, com níveis de 17-OHP superiores a 160 nmol/L foi de 20%.

Não houve conhecimento de caso falso-negativo até o momento.

A TAB. 2 demonstra os principais resultados da triagem nesse período.

TABELA 2  
Resultados da triagem para HAC, entre 09/2007 e 02/2008

	<b>Total</b>
<b>Incidência da doença</b>	1:15.211
<b>Taxa de reconvocação* %</b>	1,56
<b>Taxa de falso-positivos %</b>	0,31
<b>VPP %</b>	2,1
<b>Especificidade %</b>	99,7
<b>Sensibilidade %</b>	100

\*Convocação para nova amostra ou para consulta médica

### 5.3.2 Distribuição dos valores de 17-OHP, em papel-filtro, da população triada

A média da 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro das 106.476 crianças triadas no período foi de  $34 \pm 21$  nmol/L, com mediana de 27 nmol/L (0,06-660). O percentil 99 da 17-OHP foi de 108 nmol/L.

O GRÁF. 1 ilustra a distribuição dos valores de 17-OHP na população triada.

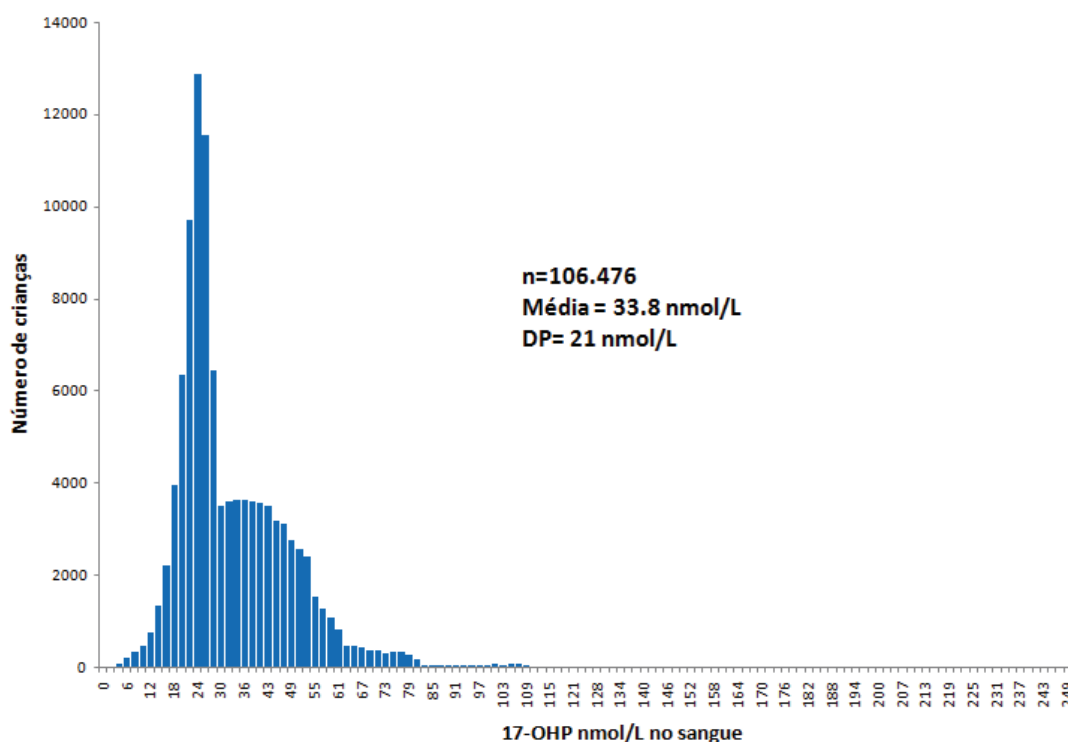


GRÁFICO 1 - Histograma ilustrando a distribuição dos valores de 17-OHP na população triada entre 09/2007 e 02/2008.

Quando as 13.298 crianças com peso ao nascimento informado foram distribuídas em quatro grupos de peso - **(1)**  $\geq 2.500$  g,  $n=10.222$ ; **(2)** 2.000-2.499 g  $n=1.357$ ; **(3)** 1.500-1.999 g,  $n=971$ ; **(4)**  $< 1.500$  g,  $n=748$  -, os percentis 50 e 99 da 17-OHP foram, respectivamente, 35 e 109 nmol/L, 47 e 221 nmol/L, 58 e 260 nmol/L e 96 e 344 nmol/L, respectivamente. A variação dos valores de 17-OHP de acordo com o peso ao nascimento está apresentada no GRÁF. 2.

Houve diferença estatisticamente significativa nas medianas da 17-OHP entre os quatro grupos ( $p < 0,001$ ) e quando os grupos foram comparados 2 a 2 ( $p < 0,001$ ).

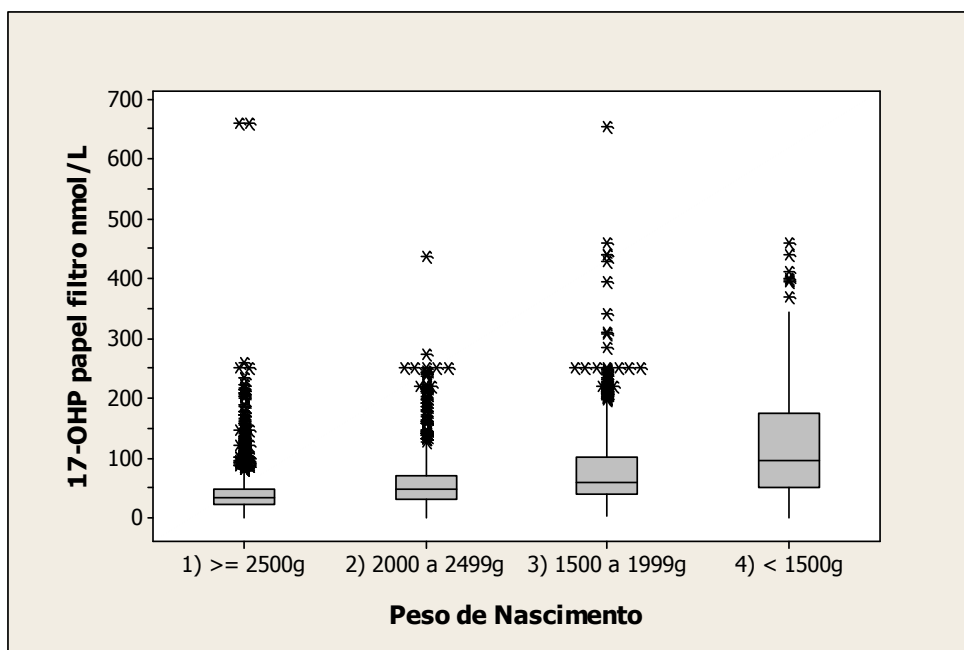


GRÁFICO 2 - Distribuição dos valores de 17-OHP, de acordo com quatro grupos de peso ( $p < 0,001$ ).

As caixas representam o intervalo interquartil (percentis 25-75); as linhas horizontais representam a mediana; e os extremos das hastes representam o mais baixo e o mais alto valores até 1,5 vez o intervalo interquartil. Os asteriscos (\*) representam valores discrepantes (*outliers*).

### 5.3.3 Caracterização das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG

#### 5.3.3.1 Características gerais

Entre as 315 crianças consideradas falso-positivas e acompanhadas no PETN-MG, 267 já apresentaram normalização completa dos esteroides adrenais e receberam alta; 48 crianças (15%) ainda estão em acompanhamento e vêm apresentando redução progressiva e espontânea dos níveis de esteroides adrenais.

Houve predominância de 62% do sexo masculino entre os casos falso-positivos acompanhados (relação M:F de 1,6:1). A maioria das crianças (76%) tinha história de intercorrência perinatal e 63% eram baixo peso e/ou prematuras.

As características dessas crianças são apresentadas na TAB. 3.

TABELA 3

Características das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG

<b>Crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG</b>	
Número de crianças	315
Média de dias de vida à triagem 1ª amostra ( $\pm$ DP)	8 (4)
Média de dias de vida à triagem 2ª amostra ( $\pm$ DP)	25 (8)
Média de dias de vida à consulta médica ( $\pm$ DP)	71 (33)
Consanguinidade entre os pais (%)	7 (2,2)
História de intercorrência perinatal (%)	239 (76)
Prematuridade (<37 sem) (%)	193 (61)
Baixo peso (<2500 g) (%)	160 (51)
Peso adequado para idade gestacional (%)	287 (91)
Receberam alta (%)	267 (85)

DP= desvio-padrão.

Entre as intercorrências perinatais, a mais comum foi a prematuridade (80,8%). Outras intercorrências neonatais como sepse (n=17), icterícia com necessidade de fototerapia (n=5), aspiração de líquido meconial (n=3), asfixia (n=3) e outros (n=6) foram relatadas em 14,2% das crianças. Os demais casos apresentavam relato de intercorrência exclusivamente materna durante o final da gestação (hipertensão, diabetes *mellitus* gestacional, oligohidrâmnio e ameaça de trabalho de parto prematuro) (GRÁF. 3).

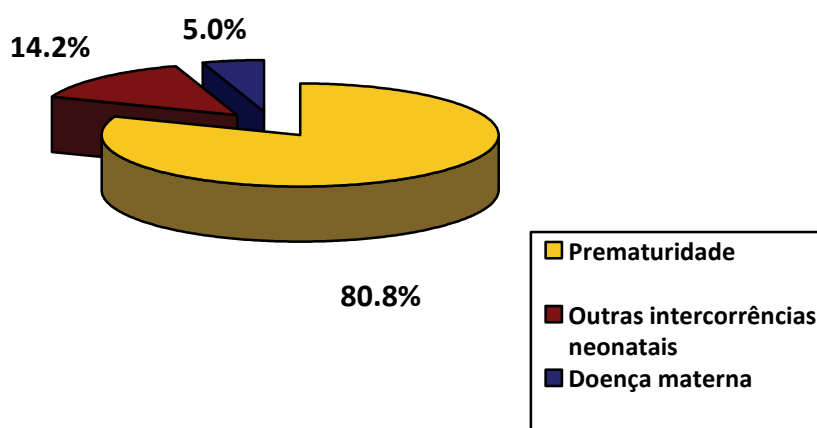


GRÁFICO 3 - Intercorrências perinatais nas crianças falso-positivas.

Das 193 crianças falso-positivas prematuras, 38 (20%) não tinham baixo peso ao nascimento.

Em relação às 160 crianças falso-positivas com baixo peso ao nascimento, 155 (97%) eram prematuras e apresentavam distribuição do peso conforme o GRÁF. 4.

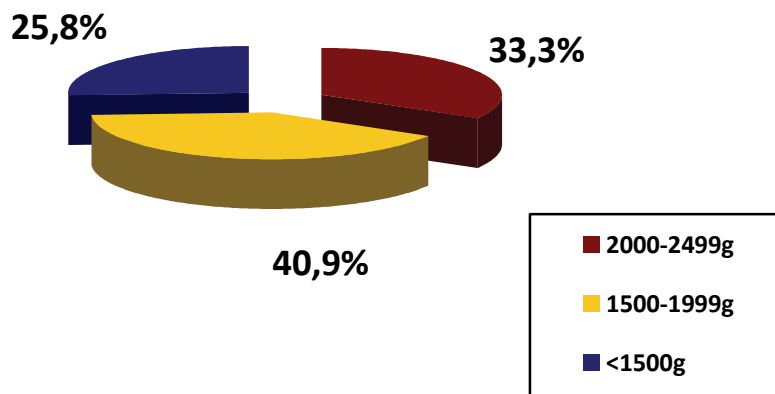


GRÁFICO 4 - Distribuição das crianças falso-positivas com baixo peso ao nascimento, em três grupos: 2.000-2.499 g, 1.500-1.999 g e <1.500 g.

### 5.3.3.2 Características laboratoriais

A mediana da 17-OHP entre as crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG, na primeira amostra em papel-filtro, foi de 132 nmol/L, variando de 80 a 287 (n=315); e na segunda amostra em papel-filtro foi de 104 nmol/L, variando de 80 a 250 (n=190).

A mediana da 17-OHP sérica foi de 1.720 ng/dL (135-3.410) e da androstenediona sérica foi de 3,2 ng/mL (0,3-49); 70 crianças (22%) nunca apresentaram androstenediona alterada. A mediana da testosterona sérica foi de 1,3 ng/mL (0,01-4,5), sendo que entre os meninos foi de 1,7 ng/mL (0,01-4,5) e entre as meninas, de 0,46 ng/mL (0,01-1,6) (p<0,001).

As crianças que apresentaram normalização dos níveis de 17-OHP receberam alta com mediana de 17 meses de vida (2,6-34). A mediana do tempo para normalização da 17-OHP sérica foi de 13,5 meses (0-33) e da androstenediona sérica foi de 3,3 meses (0-29) (p<0,001).

As médias do Na e do K nas crianças falso-positivas foram de  $137 \pm 2$  mmol/L e  $5,4 \pm 0,5$  mmol/L, respectivamente.

Os níveis de 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro entre as crianças falso-positivas com intercorrência perinatal foram significativamente mais elevados quando comparados com as crianças sem intercorrência perinatal ( $p < 0,001$ ) (TAB. 4).

Os níveis de 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro entre as crianças falso-positivas prematuras foram significativamente mais elevados do que nas não prematuras ( $p < 0,001$ ). O mesmo ocorreu quando foi comparado o grupo de crianças com baixo peso ao nascimento com o de crianças sem baixo peso ao nascimento ( $p < 0,001$ ) (TAB. 4).

TABELA 4

Mediana da 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro em relação a: intercorrência perinatal, idade gestacional e peso ao nascimento, nas crianças falso-positivas

	17-OHP papel-filtro (nmol/L)	p
<b>Com intercorrências n= 239</b>	162	
<b>Sem intercorrências n= 76</b>	102	<0,001
<b>Prematuros n=193</b>	172	
<b>Não prematuros n=122</b>	105	<0,001
<b>Baixo peso n=160</b>	183	
<b>Não baixo peso n=155</b>	106	<0,001

Quando foi realizada a comparação dos esteroides adrenais entre as crianças falso-positivas e doentes, os seguintes resultados, demonstrados na TAB. 5, foram encontrados:

TABELA 5

Comparação das medianas (variações) dos esteroides adrenais entre crianças falso-positivas e doentes do período de 09/2007 a 02/2008

	Crianças falso-positivas n= 315	Crianças doentes n= 7	p
<b>17-OHP papel-filtro - nmol/L</b>	132 (80-287)	250 (196-660)	<0,001
<b>17-OHP sérica - ng/dL</b>	1720 (135-3410)	2880 (2270-4180)	<0,001
<b>Androstenediona sérica - ng/mL</b>	3,2 (0,3-49)	31 (0,3-51)	0,05
<b>Testosterona sérica - ng/mL</b>	1,3 (0,01-4,5)	1,2 (0,3-6,0)	0,42



Os GRÁF. 5 a 8 demonstram a distribuição dos esteroides adrenais nesses dois grupos de crianças.

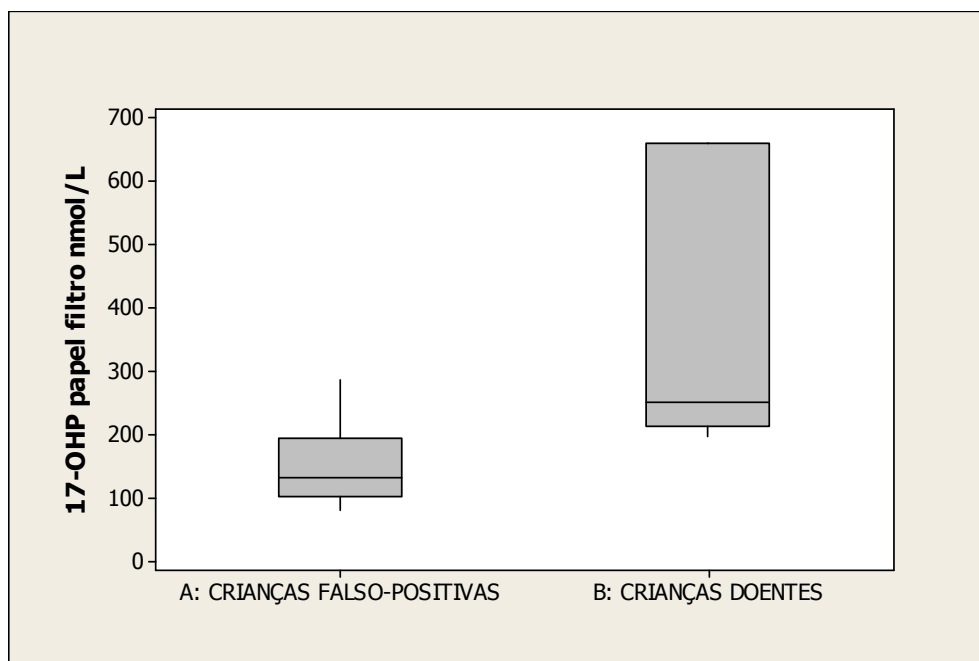


GRÁFICO 5 - Distribuição dos valores de 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro, entre crianças falso-positivas e doentes ( $p < 0,001$ ).

As caixas representam o intervalo interquartil (percentis 25-75); as linhas horizontais representam a mediana; e os extremos das hastes representam o mais baixo e o mais alto valores até 1,5 vez o intervalo interquartil.

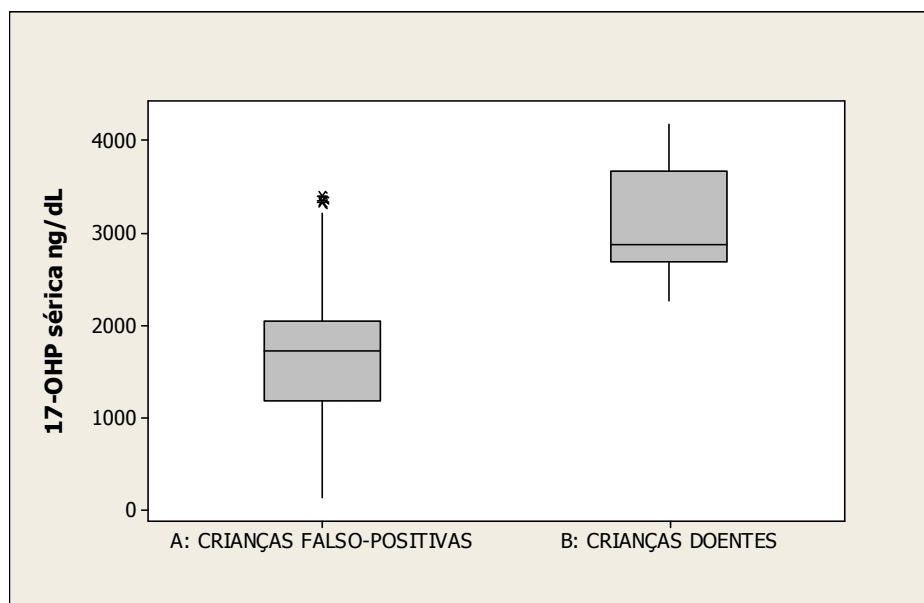


GRÁFICO 6 - Distribuição dos valores de 17-OHP sérica entre crianças falso-positivas e doentes ( $p < 0,001$ ).

As caixas representam o intervalo interquartil (percentis 25-75); as linhas horizontais representam a mediana; e os extremos das hastes representam o mais baixo e o mais alto valores até 1,5 vez o intervalo interquartil. Os asteriscos (\*) representam valores discrepantes (*outliers*).

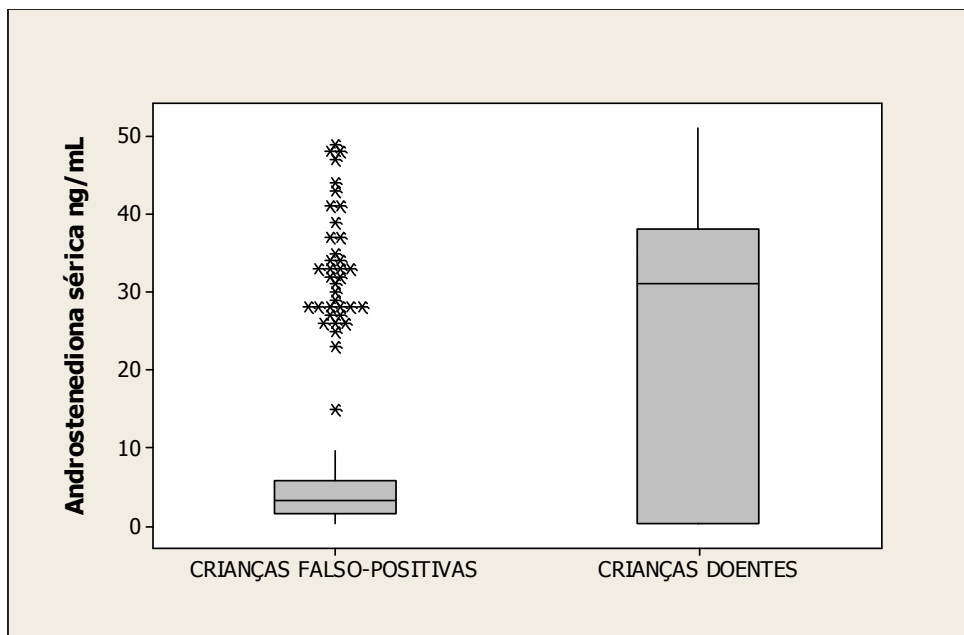


GRÁFICO 7 - Distribuição dos valores da androstenediona sérica entre crianças falso-positivas e doentes ( $p = 0,05$ ).

As caixas representam o intervalo interquartil (percentis 25-75); as linhas horizontais representam a mediana; e os extremos das hastes representam o mais baixo e o mais alto valores até 1,5 vez o intervalo interquartil. Os asteriscos (\*) representam valores discrepantes (*outliers*).

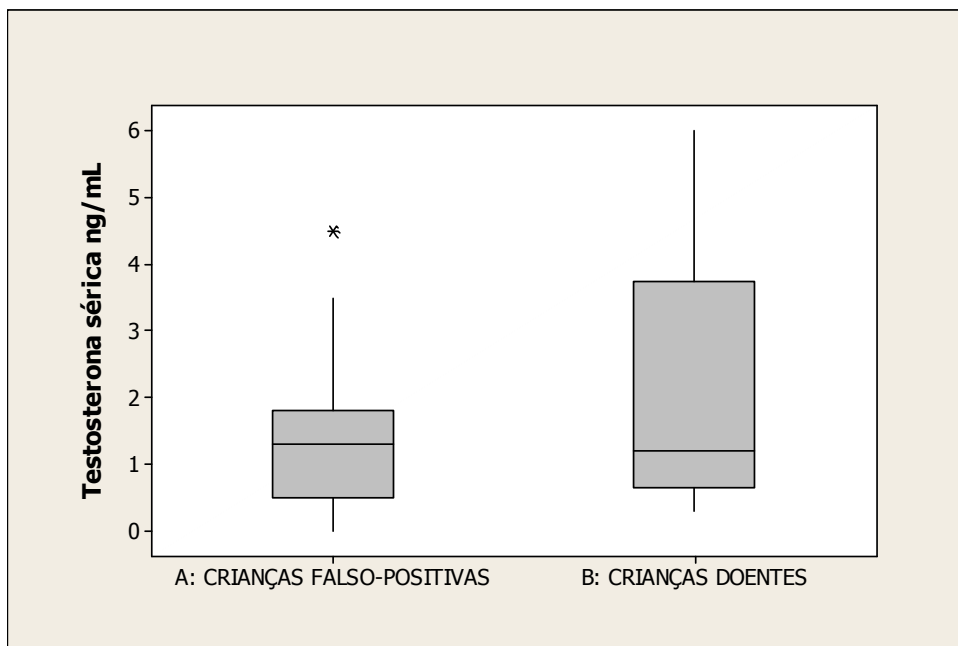


GRÁFICO 8 - Distribuição dos valores da testosterona sérica entre crianças falso-positivas e doentes ( $p=0,42$ ).

As caixas representam o intervalo interquartil (percentis 25-75); as linhas horizontais representam a mediana; e os extremos das hastes representam o mais baixo e o mais alto valores até 1,5 vez o intervalo interquartil. O *asterisco* (\*) representa valor discrepante (*outlier*).

### 5.3.3.3 Análise genética

Entre as crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG, 51 (16%) foram submetidas à análise molecular do gene CYP21A2. Em 17 delas (33,3%) foi detectada heterozigose. Nenhuma foi detectada com a forma não clássica da doença (APÊNDICE B).

As mutações detectadas foram: V281L ( $n=8$ ), Q318X ( $n=7$ ), I2 *splice* ( $n=1$ ), I172N ( $n=1$ ).

A mediana da 17-OHP na primeira amostra em papel-filtro nas crianças falso-positivas heterozigotas foi de 191 nmol/L, mais alta do que a mediana das crianças não heterozigotas (122 nmol/L), mas sem significância estatística ( $p=0,07$ ).

As porcentagens de prematuros entre as crianças heterozigotas e não heterozigotas foram 71 e 62%, respectivamente, cuja diferença não apresentou significância estatística ( $p=0,52$ ).

#### 5.3.3.4 Crianças ainda em observação clínica em 20/07/2010

Em 20/07/2010, data em que foi realizada a análise dos dados, 48 crianças ainda não tinham recebido alta do programa e estavam em observação clínica. Dentre elas, 50% eram meninos e 56% tinham história de prematuridade. Essas crianças não possuíam níveis de 17-OHP séricos confirmatórios significativamente diferentes em relação às crianças falso-positivas que já haviam recebido alta (mediana de 1855 *versus* 1710 ng/dL, respectivamente;  $p=0,06$ ). À última avaliação, com idade média de  $24 \pm 6$  meses, a mediana da 17-OHP sérica era de 142 ng/dL (74-1820).

#### 5.3.4 Proposta de novos pontos de corte para a 17-OHP

A partir dos percentis 99 da 17-OHP da população triada, foram propostos dois novos pontos de corte: 110 nmol/L para crianças nascidas com peso igual ou superior a 2.500 g e 220 nmol/L para crianças nascidas com peso inferior a 2.500 g (substituindo os pontos de corte de 80 e 160 nmol/L, respectivamente).

Considerando que apenas reduzida parte da população triada era sabidamente baixo peso ou prematura e utilizando os dois novos pontos de corte referidos, a taxa de reconvocação geral seria de 0,5%. A taxa de reconvocação entre as crianças com baixo peso ou prematuras seria de 5%.

Se as 328 crianças falso-positivas fossem triadas utilizando os dois novos pontos de corte, no mínimo 248 seriam consideradas normais (76% de redução). A taxa de falso-positivos seria de 0,075%. Todas as sete crianças doentes desse período seriam convocadas e o VPP seria de 8,0%.

Se se levasse em consideração a idade gestacional para os cálculos (110 nmol/L para crianças nascidas com idade gestacional igual ou superior a 37 semanas e 220 nmol/L para crianças nascidas com idade gestacional inferior a 37 semanas), haveria redução de 78% no número de falso-positivos (taxa de 0,07%). Uma criança doente prematura e sem baixo peso ao nascimento seria perdida, o que levaria ao VPP de 7,6%.

Se fossem utilizados quatro pontos de corte (110, 220, 260 e 344 nmol/L), baseados no percentil 99 da 17-OHP para as respectivas categorias de peso ( $\geq 2.500$  g, 2.000-2.499 g, 1.500-1.999 g e  $< 1.500$  g), no mínimo 270 falso-positivos deixariam de ser convocados

(82% de redução). Com isso, a taxa de falso-positivos cairia para 0,054% e o VPP seria de 10,8%.

Das oito crianças que inicialmente foram consideradas doentes, mas que suspenderam o tratamento e foram reclassificadas como falso-positivas, seis não seriam convocadas se o ponto de corte fosse ajustado para as quatro categorias de peso. As duas crianças que continuariam sendo convocadas eram prematuras, mas apresentavam peso ao nascimento igual ou superior a 2.500 g.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Triagem neonatal: histórico e considerações gerais

A triagem neonatal teve início no começo da década de 1960, quando Güthrie desenvolveu uma técnica para detecção da fenilcetonúria a partir do sangue colhido em papel com alto grau de absorção. O tratamento da fenilcetonúria baseado na restrição de fenilalanina na dieta já era conhecido uma década antes, mas se realizado após início dos sintomas da doença, não revertia os danos neurológicos. Güthrie tinha como objetivo identificar indivíduos com fenilcetonúria em fase pré-sintomática para realizar o tratamento mais precocemente<sup>87</sup>. Na década 70, iniciou-se a pesquisa do hipotireoidismo congênito pela dosagem do T4 utilizando-se o mesmo material colhido para a pesquisa da fenilcetonúria. Desde então, milhares de crianças têm sido beneficiadas com a prevenção da deficiência mental<sup>88</sup>.

As primeiras experiências de triagem neonatal começaram no Brasil ainda na década de 1960, tendo sido o pediatra Prof. Benjamim Schmidt o seu introdutor<sup>89</sup>. A Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de São Paulo, sob sua direção, iniciou a triagem neonatal para fenilcetonúria em 1976 e, em 1980, foi adicionada a triagem para o hipotireoidismo congênito<sup>90</sup>.

Em 1990, o Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei 8.069/1990) definiu a triagem neonatal como obrigatória. Em 1992, por meio da Portaria 22, o Ministério da Saúde (MS) reafirmou a obrigatoriedade da triagem neonatal para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. Esses procedimentos foram, então, acrescentados à tabela do Serviço Único de Saúde (SUS) para serem cobrados por qualquer laboratório, o que deu mais ímpeto à realização dos testes de triagem neonatal nos diversos estados e ao surgimento dos primeiros programas com cobertura estadual<sup>89,90</sup>.

Em 2001, foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pela Portaria 822, de 06 de junho, do MS<sup>91</sup>. Esse programa ampliou a triagem neonatal no Brasil para quatro doenças (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, anemia falciforme e fibrose cística) e objetiva atingir 100% de cobertura dos recém-nascidos vivos. Trata-se de

um programa público, coordenado pelo MS, embora conte com laboratórios e outras instituições privadas em sua estrutura. Define o processo de triagem neonatal em cinco etapas, de forma semelhante ao preconizado pelo *American College of Medical Genetics*<sup>92</sup>, ou seja, teste laboratorial, busca ativa dos casos suspeitos, confirmação diagnóstica, tratamento e seguimento por equipe multidisciplinar. A implantação do programa deve ocorrer em três fases, de acordo com o nível de organização e de cobertura de cada estado. Na fase I, as doenças triadas são a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congênito. Na fase II, é adicionada ao painel da fase I a triagem para anemia falciforme e outras hemoglobinopatias. Na fase III, acrescenta-se ao painel de doenças a triagem para fibrose cística<sup>89</sup>.

Atualmente, todos os estados brasileiros oferecem a triagem neonatal para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito de acordo com os protocolos do PNTN. Onze estados estão na fase II e apenas quatro na fase III (Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e Espírito Santo). Segundo dados de 2007, a cobertura populacional da triagem neonatal no Brasil é de 78,9%<sup>93</sup>. No entanto, alguns estados relatam cobertura acima de 95% para as quatro doenças<sup>94,95</sup>.

O Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG) foi implantado em 1993 e é coordenado pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD). O NUPAD é órgão complementar da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e foi credenciado em 2001, pelo MS, como único serviço de referência em triagem neonatal do estado. O PETN-MG está na fase III desde 2003, com cobertura populacional de 94,6% (dados de 2007)<sup>96</sup>, apresentando, portanto, amplas condições de implementação de outros programas de triagem.

Laboratórios privados realizam testes diagnósticos para várias outras doenças passíveis de triagem neonatal, mas ainda não incluídas no PNTN. Esses laboratórios não têm como objetivo a triagem universal, nem participam de programa de triagem com as cinco etapas características, o que pode gerar alguns problemas. As famílias das crianças com triagem positiva para HAC, por exemplo, geralmente não são orientadas quanto à possibilidade de falso-positividade do teste e podem iniciar acompanhamento com médico não treinado, o que leva, muitas vezes, a tratamentos desnecessários com consequências maléficas para a criança.

O PNTN considera a possibilidade de ampliar a gama de doenças a serem pesquisadas, se houver comprovado benefício para a população<sup>30</sup>.

A triagem neonatal para HAC ainda não é aceita de maneira universal e existe polêmica em vários países sobre incluí-la ou não nos programas de triagem. Entretanto, essa polêmica não é exclusiva da HAC, muito pelo contrário. As doenças triadas em cada país, ou mesmo nas diversas regiões ou estados de um mesmo país, variam muito, dependendo das decisões políticas de saúde baseadas em aspectos epidemiológicos, étnicos, sociais, econômicos e éticos<sup>97</sup>.

A implantação da triagem para HAC em Minas Gerais vem sendo considerada devido à avaliação de um contexto de saúde no estado que não privilegia a realização de diagnósticos corretos e rápidos como demanda essa entidade; sua inclusão, como projeto-piloto, serviu para referendar essa necessidade.

Parece existir tendência à triagem de um número cada vez mais alto de doenças, principalmente após o advento do espectrômetro de massa em *tandem*. Com a utilização dessa nova tecnologia, todo o processo de análise leva em torno de dois minutos e, ao final, mais de 40 doenças metabólicas podem ser identificadas a partir de uma única amostra<sup>98</sup>, entre elas aminoacidopatias, defeitos de oxidação de ácidos graxos e acidemias orgânicas.

As doenças mais triadas em todo o mundo são: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, fibrose cística, galactosemia, deficiência de biotinidase, hiperplasia adrenal congênita, doença do xarope de bordo, deficiência de desidrogenase acilcoenzima A de cadeia média e tirosinemia<sup>26</sup>.

O esforço para realizar um programa de triagem neonatal deve ser empreendido quando um distúrbio metabólico preenche os seguintes requisitos: a) o distúrbio traz, se não tratado, graves consequências para a saúde do afetado; b) existe um tratamento que pode modificar substancialmente a história natural da doença; c) o tratamento é significativamente mais eficaz quando implantado na fase pré-clínica da doença; d) existe um teste de triagem que é simples, eficiente, aplicável em larga escala e de baixo custo<sup>90</sup>. A HAC atende, em tese, a esses requisitos, exceto o quarto, já que o teste de triagem exhibe alguns problemas.

A triagem neonatal nem sempre consegue seguir todos os requisitos, uma vez que o grupo de doenças que podem ser triadas é muito heterogêneo. Um dos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), por exemplo, é a tratabilidade. No entanto, esse princípio da tratabilidade já foi parcialmente transgredido quando se introduziu a triagem para anemia falciforme e outras hemoglobinopatias e também para a fibrose cística. Outro exemplo é a triagem por espectrometria de massa em *tandem*, utilizada para triar doenças que podem ter significado clínico, mas que não são tratáveis ou têm tratamento cujo



benefício para a saúde ainda não é bem estabelecido. Algumas dessas doenças possuem incidência muito mais baixa que 1:50.000<sup>97,99,100</sup>.

Em 2005, os EUA definiram um painel de 29 doenças para a triagem neonatal, incluindo a HAC<sup>92</sup>. Na Austrália e no Japão realiza-se a triagem ampliada sem restrições. Já na Europa, a implantação da triagem ampliada tem sido mais lenta<sup>101</sup>. Na Grã-Bretanha, por exemplo, o painel de doenças oferecido foi o mesmo do nosso país até abril de 2009, quando foi incluída a triagem para deficiência de desidrogenase acilcoenzima A de cadeia média a 100% da população daqueles países<sup>102</sup>. Essas discrepâncias e discussões em relação ao painel de doenças triadas ocorrem, portanto, mesmo entre países desenvolvidos, já que não envolvem apenas questões econômicas<sup>103</sup>.

Desde 1977, quando se tornou possível o diagnóstico precoce da HAC por meio da triagem neonatal<sup>4</sup>, ela vem sendo implantada em vários países, com comprovados benefícios. Em recente diretriz publicada sobre a doença, há forte recomendação (embora baseada em evidência de baixa qualidade) para que a mesma seja incorporada em todos os programas de triagem neonatal.<sup>22</sup>

Há demanda para inclusão da HAC nos programas de triagem, por ser uma doença relativamente frequente e potencialmente fatal. Seu reconhecimento e tratamento precoces reduzem a morbimortalidade.<sup>22</sup> Apesar disso, ainda existem controvérsias relacionadas ao custo-benefício do teste e à necessidade de mais estudos que justifiquem a triagem da doença<sup>35</sup>. A maior controvérsia refere-se ao custo e ao impacto da avaliação dos casos falso-positivos, decorrentes dos ensaios imunológicos utilizados para dosagem da 17-OHP e da elevação real nos níveis do esteroide em crianças prematuras e estressadas (doentes)<sup>104</sup>.

De acordo com essas considerações, nos locais onde a triagem para HAC pode trazer benefícios, são necessárias tentativas para redução do número de falso-positivos e aumento da viabilidade dos programas.

## **6.2 Triagem neonatal para HAC: experiência no Brasil**

A triagem neonatal para HAC é realizada como rotina no Brasil, pelo sistema público de saúde, apenas nos estados de Goiás e Santa Catarina.

Goiás foi o primeiro estado brasileiro a incluir a triagem neonatal para HAC no seu programa público de triagem. A triagem para HAC foi implantada em 1997 e já está bem

consolidada. O laboratório da APAE de Anápolis é credenciado pelo MS para realizar a triagem neonatal no estado. O teste do pezinho é rotineiramente realizado entre o terceiro e o quinto dias de vida do recém-nascido e utiliza o método imunofluorimétrico (DELFLIA®) para dosagem da 17-OHP em papel-filtro. Avaliou-se a triagem para HAC no ano de 2005, quando 82.603 crianças foram triadas (cobertura de 92,95% dos nascidos vivos do estado). Entre as 260 crianças reconvocadas, oito foram detectadas com a doença (três meninos). Uma menina com genitália ambígua mostrou níveis normais de 17-OHP à triagem e foi considerada falso-negativa. A idade de início do tratamento variou de 14 a 28 dias de vida. Oito crianças entre seis e 18 meses de idade, que persistiram com níveis elevados de 17-OHP, estavam em acompanhamento clínico na época da publicação do estudo. Essas crianças se mantinham assintomáticas mesmo sem tratamento. As sensibilidade e especificidade relatadas pelo programa foram de 87,5 e 99,98%, respectivamente<sup>8</sup>.

Já a triagem para HAC no estado de Santa Catarina foi implantada no ano de 2000. É realizada entre o terceiro e o sétimo dias de vida do recém-nascido e a dosagem da 17-OHP é processada no Laboratório Central (LACEN-SC) utilizando-se o método imunofluorimétrico (DELFLIA®)<sup>7</sup>. Não foi encontrada publicação referente aos resultados da triagem no estado de Santa Catarina.

Cardoso *et al.* publicaram, em 2005, estudo sobre a experiência do estado do Rio de Janeiro em triagem neonatal para HAC entre os anos de 1992 e 2000. A triagem neonatal não estava incluída nos programas de saúde pública e a dosagem da 17-OHP era realizada apenas quando havia solicitação pelo pediatra-assistente. A coleta foi feita em idade média de  $16,2 \pm 12,4$  dias de vida e em alguns casos as crianças eram sintomáticas. A dosagem de 17-OHP foi realizada pelo método imunofluorimétrico DELFLIA® no Centro de Diagnóstico e Pesquisa Dr. Raymundo Britto, CDP – APAE–Rio. O total de 76.360 crianças foi incluído no estudo, sendo que 38 apresentaram valores de 17-OHP acima do ponto de corte preestabelecido e foram convocadas para nova amostra. Destas, 20 foram convocadas para consulta, sendo que o diagnóstico da forma clássica da HAC foi confirmado em 11 (seis do sexo feminino, oito perdedoras de sal). A pesquisa avaliou os níveis de 17-OHP das crianças convocadas. Os pacientes com a forma virilizante simples mostraram valores mais baixos de 17-OHP que os perdedores de sal na primeira amostra, sendo, em alguns casos, indistinguíveis dos encontrados em alguns pacientes falso-positivos. Na segunda amostra, porém, esses valores elevaram-se, havendo nítida distinção quanto aos falso-positivos. Os autores concluíram que a dosagem da 17-OHP na triagem neonatal para HAC é exame eficaz para discriminar indivíduos normais de doentes<sup>47</sup>.

Outros programas de triagem para HAC, não incluídos no sistema público de saúde, acontecem no Brasil, como o programa da APAE de São Paulo.

Em Minas Gerais, a triagem para HAC foi incluída, como projeto-piloto, no PETN-MG, já consolidado desde 1993 e com ampla cobertura da população do estado. A dosagem da 17-OHP foi realizada pelo método ELISA, diferentemente dos estados de Goiás e Santa Catarina, que utilizam o método imunofluorimétrico (DELFIA®).

O método imunofluorimétrico DELFIA® tem substituído o radioimunoensaio e o ELISA em vários países, por ser altamente automatizado e apresentar menos reação cruzada com os esteroides interferentes<sup>42</sup>. A utilização do ELISA para dosagem da 17-OHP foi descrita no Japão<sup>105</sup>.

O PETN-MG utilizou o ensaio UMELISA 17-OH Progesterona NEONATAL®. O ultramicro ELISA (UMELISA®) é um ensaio com o qual o PETN-MG já possui experiência de quase 20 anos, sendo de fácil aquisição, já que é utilizado para a triagem neonatal do hipotireoidismo congênito (UMELISA TSH®). O UMELISA® foi desenvolvido em Cuba na década de 80 e permite o estudo de elevado número de amostras com o mínimo custo possível. Possui sensibilidade equivalente à dos testes microELISA atuais, utilizando ultramicrovolumes de amostras e reagentes. O UMELISA® mostrou-se um ensaio simples, preciso e rápido, comparável ao *kit* japonês comercialmente disponível (ICN *Neoscreen* ELISA 17-OHP *kit*).

### **6.3 Achados da triagem para HAC em Minas Gerais**

#### **6.3.1 Incidência da HAC**

A incidência mundial da forma clássica da HAC tem sido descrita em 1:15.000<sup>1</sup>, mas com acentuadas variações entre diversos países e regiões. No Brasil, a incidência relatada no sul do país foi de 1:7.500 e em Goiás de 1:10.325<sup>8</sup>, muito mais alta do que a encontrada no presente estudo (1:19.927). Silveira *et al.* discutem a elevada incidência da doença encontrada no sul do país e ressaltam que ela não pode ser considerada real, já que foi obtida de dados de triagem voluntária, paga, com resultados clínicos não publicados<sup>8</sup>.

Uma possível explicação para a incidência mais baixa encontrada no presente estudo, pode ser o longo período de acompanhamento clínico-laboratorial das crianças com triagem positiva (mínimo de 2,5 anos). Num primeiro momento, ocorreu falsa percepção

de elevada incidência da doença no estado. Posteriormente, com o seguimento clínico-laboratorial, ficou demonstrado que metade das crianças inicialmente consideradas doentes era, na verdade, falso-positiva. Essas crianças apresentavam 17-OHP sérica confirmatória elevada e pelo menos um sinal sugestivo da doença (ganho de peso insuficiente, genitália duvidosa e/ou hiponatremia leve). Após o início do tratamento, constatou-se completa normalização da 17-OHP, mesmo sem o ajuste periódico da dose do glicocorticoide; e os esteroides adrenais se mantiveram dentro do valor de referência após a suspensão do tratamento. Com isso, apenas crianças com doença confirmada pelo seguimento clínico-laboratorial foram consideradas para o cálculo da incidência no presente estudo.

A incidência encontrada foi um pouco mais baixa do que a relatada nos EUA e em alguns países da Europa, mas foi equivalente à relatada em países como o Japão (1:19.111), Nova Zelândia (1:21.270) e em regiões como o nordeste da Itália (1:21.380)<sup>34,107,108</sup>. Pode ser considerada, portanto, semelhante à incidência mundial.

Este foi o primeiro estudo que avaliou a incidência da HAC no estado de Minas Gerais. A incidência encontrada pode ser considerada confiável, levando-se em conta a ampla cobertura da população pelo PETN-MG (quase 100%) e o elevado número de crianças triadas, embora por curto período de tempo. Não é possível afirmar, entretanto, que nenhuma criança afetada tenha sido perdida.

A relação de crianças doentes do sexo masculino em relação às do sexo feminino foi próxima de um, ou seja, a esperada para uma doença autossômica recessiva.

### **6.3.2 Avaliação dos benefícios e dificuldades na detecção das crianças doentes**

Estudos recentes realizados em países desenvolvidos demonstraram incidência semelhante da doença entre populações triadas *versus* não triadas e sugeriram que o principal benefício da triagem seria evitar as crises de perda de sal e não evitar mortes<sup>3,80</sup>. O presente estudo, entretanto, demonstrou que a realidade em Minas Gerais é diferente. Foi encontrado baixo índice de suspeição clínica da doença - em 50% dos casos o diagnóstico foi atribuído inteiramente à triagem. Apenas crianças do sexo feminino tiveram o diagnóstico clínico suspeito devido à genitália ambígua. A menina virilizante simples com genitália Prader I e os três meninos perdedores de sal não seriam diagnosticados precocemente, sendo que os meninos poderiam morrer de desidratação e choque. Esses achados sugerem que, sem a triagem, a incidência da doença encontrada no estado de

Minas Gerais poderia ser mais baixa, já que possivelmente algumas crianças morreriam sem diagnóstico.

Apesar dos esforços, não foi possível evitar hiponatremia em algumas crianças, pela demora no início do tratamento. Esse atraso foi atribuído a diversos fatores, entre eles o elevado número de crianças falso-positivas, com conseqüente atraso na avaliação clínica pelo endocrinologista. Esse problema poderia ser resolvido pelo ajuste adequado dos pontos de corte, levando a mais agilidade no acompanhamento das crianças com triagem positiva. A demora no início do tratamento foi atribuída, também, à falta de experiência dos médicos pediatras em lidar com a doença. Duas meninas tiveram o tratamento iniciado tardiamente e apresentaram hiponatremia grave, apesar de genitália ambígua notada ao nascimento. A triagem, como programa de ampla abrangência, pode ajudar a minimizar esse problema porque, ao incluir a HAC na investigação rotineira dos recém-nascidos, a doença torna-se mais conhecida e abordada pelos pediatras. Essa situação, apesar do processo implementado como projeto-piloto, acabou ocorrendo parcialmente e resultando em aumento da demanda “extratriagem” para avaliação de crianças com suspeita de HAC.

Outra questão importante a ser discutida em relação ao atraso no início do tratamento é a idade à coleta da amostra. Segundo o *Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology*, a triagem neonatal para HAC deve ser realizada no terceiro dia de vida (48 a 72 horas após o nascimento) e definitivamente não deve ser realizada após a primeira semana. Além disso, o resultado da triagem idealmente deve estar disponível até o 10º dia de vida da criança<sup>109</sup>. O atraso na realização da triagem pode inviabilizar seu maior objetivo - evitar as crises de perda de sal, diminuindo a morbimortalidade da doença. Por outro lado, a realização do teste de triagem deve apresentar adequado custo-benefício. Em muitos países a triagem neonatal é realizada ainda na maternidade e por isso tem sido realizada até antes do recomendado, pela alta precoce dos recém-nascidos. Nesses casos, os valores de referência para a 17-OHP devem ser ajustados de acordo com o dia de vida à coleta, já que os níveis desse esteroide são muito elevados nos primeiros dias de vida pós-natal<sup>50</sup>. A coleta precoce também pode levar ao aumento do número de casos falso-negativos, já que nas crianças afetadas os níveis de 17-OHP são inicialmente mais baixos e aumentam com o passar do tempo<sup>22</sup>. No Brasil, o teste do pezinho é realizado após a alta da maternidade e, segundo o PNTN, idealmente deve ser colhido entre o terceiro e o sétimo dias de vida da criança<sup>110</sup>. Em Minas Gerais, o NUPAD recomenda que a coleta seja feita no quinto dia de vida<sup>111</sup>. Infelizmente, o que se pode perceber é que muitas vezes essa coleta é realizada com atraso. Entre as oito crianças

com HAC detectadas neste estudo, três realizaram a triagem após o sétimo dia de vida. Esse fato prejudica não apenas o diagnóstico e tratamento precoces da HAC, mas também das outras doenças incluídas no programa. O tratamento para o hipotireoidismo congênito, por exemplo, deve ser instituído o mais precocemente possível, na tentativa de evitar as sequelas neurológicas. Esforços devem ser feitos, portanto, no sentido de adequar o momento de realização do teste.

Estudo na Suécia (1998) demonstrou que, após a implantação da triagem, a mediana de dias de vida ao diagnóstico dos meninos com HAC passou de 21 para nove dias<sup>25</sup>. Dados da Holanda, publicados em 2001, mostraram que todas as crianças com HAC detectadas pela triagem iniciaram tratamento antes do 10º dia de vida, sendo possível evitar crise grave de perda de sal<sup>3</sup>.

Com esses dados fica claro que muito se tem a avançar. Na presente investigação, o diagnóstico clínico da HAC mostrou-se deficiente, o que reforça a necessidade de implantação da triagem para HAC no nosso estado. Por outro lado, o diagnóstico realizado pela triagem possivelmente salvou vidas, mas ainda foi tardio. Os resultados desse projeto-piloto deverão ser utilizados para que as muitas dificuldades sejam superadas na implantação de um programa definitivo no estado. Um programa de triagem bem estabelecido e ágil pressupõe o diagnóstico e abordagem das crianças no mínimo tempo possível. Os resultados de outros programas no estado, como a triagem neonatal para o hipotireoidismo congênito, demonstra como a estruturação ao longo dos anos mostrou-se acertada. Implantada há 17 anos, já realizou o diagnóstico precoce de mais de 1.000 crianças com a doença. A mediana de 19 dias de vida ao início do tratamento tem se mostrado eficaz na prevenção do retardo mental<sup>112</sup>, embora também possa ser ainda melhorada.

Em relação aos níveis séricos de 17-OHP das crianças doentes, foram encontrados, no presente estudo, níveis mais baixos do que os relatados na literatura. Os níveis de 17-OHP séricos confirmatórios dosados à primeira consulta (em média, com 38 dias de vida), variaram de 2.160 a 4.180 ng/dL. Níveis de 17-OHP séricos basais medidos por radioimunoensaio geralmente excedem 10.000 ng/dL em crianças com a forma clássica da doença<sup>13</sup>. No entanto, muitas crianças são diagnosticadas com valores inferiores. Segundo Balsamo *et al.*, cerca de 10% dos recém-nascidos a termo afetados pela forma clássica da doença podem apresentar níveis basais iniciais baixos de 17-OHP<sup>84</sup>. Além disso, os níveis de 17-OHP aumentam com o tempo quando o recém-nascido é afetado pela doença<sup>52</sup>, o que poderia explicar valores menores em crianças mais jovens.

Os níveis de 17-OHP séricos não foram estatisticamente diferentes entre as crianças perdedoras de sal e virilizantes simples, o que impossibilitou a classificação da forma clínica da doença baseando-se apenas nos níveis desse esteroide.

### 6.3.3 Perspectivas de avanço na operacionalização da triagem

No presente trabalho, a maioria das crianças com primeira amostra alterada apresentou valores de 17-OHP limítrofes (entre 80 e 160 nmol/L), sendo convocadas para nova amostra em papel-filtro. A maioria dessas crianças exibiu segunda amostra normal e foi liberada. A realização da triagem em duas etapas, mesmo utilizando o mesmo ensaio imunológico, possibilitou importante diminuição no número de crianças convocadas para consulta e, conseqüentemente, no número de crianças falso-positivas. Ao mesmo tempo, não atrasou o diagnóstico das crianças doentes, já que elas tinham valores muito elevados de 17-OHP na primeira amostra (>160 nmol/L), sendo convocadas diretamente para consulta médica.

Em recente publicação sobre o manejo da HAC, é recomendado que a triagem neonatal seja realizada em duas etapas, já que muitos problemas gerados pelo acompanhamento das crianças com triagem positiva poderiam ser evitados com a utilização adicional de testes mais específicos. Uma das recomendações é de que seja utilizado ensaio imunológico inicial, seguido de avaliação adicional dos casos positivos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em *tandem* (CL-EMEM).<sup>22</sup>

Na Alemanha, em 2007, utilizou-se a CL-EMEM para avaliação do perfil de esteroides de crianças com triagem positiva em teste imunológico. 17-OHP, 21-deoxicortisol e cortisol foram dosados na mesma amostra em papel-filtro. O teste apresentou VPP de 100% quando a soma da 17-OHP com 21-deoxicortisol dividida pelo cortisol excedeu 0,53<sup>67</sup>. Se esses resultados forem reproduzidos em outros programas, esse poderá se tornar o método de escolha na confirmação de casos com triagem inicial positiva. Se o tempo de análise puder ser melhorado, o método poderá ser utilizado já como exame de primeira etapa, substituindo completamente os problemáticos ensaios imunológicos existentes<sup>113</sup>. Um dado que não pode ser ignorado, entretanto, é o custo desse método, que tem inviabilizado seu uso de forma mais universal, até o momento.

A abordagem genética também tem sido proposta como teste de segunda etapa.<sup>22</sup> As mutações no gene CYP21A2 podem ser detectadas de ácido desoxirribonucleico

(DNA) extraído da mesma amostra de sangue seco utilizada para dosagem hormonal. Devido ao fato de mais de 90% dos alelos mutantes apresentarem uma das 10 mutações mais frequentes (deleções ou conversões gênicas), pacientes sem essas mutações provavelmente não são afetados pela doença<sup>22</sup>.

Muitos estudos de genotipagem de amostras triadas têm sugerido que essa é uma ferramenta adicional potencialmente útil<sup>65,66</sup>. Nenhum estudo em larga escala, entretanto, publicou resultados demonstrando a eficácia da genotipagem como exame de segunda etapa na triagem. Além disso, a genotipagem possui maior custo por amostra, quando comparada com a CL-EMEM<sup>22</sup>.

Silveira *et al.* (2008)<sup>8</sup> realizaram análise molecular do gene CYP21A2 de pacientes que apresentaram triagem positiva no programa estadual de triagem neonatal de Goiás. Em todas as crianças com diagnóstico de HAC que estavam em tratamento e que tinham níveis muito elevados de 17-OHP na triagem, foram detectadas mutações predizendo deficiência grave da atividade enzimática, em ambos os alelos. Entre as crianças com diagnóstico incerto (níveis séricos de 17-OHP persistentemente elevados e ausência de sintomas mesmo sem tratamento), foram detectados genótipos compatíveis com as formas virilizante simples e não clássica da doença, além de indivíduos heterozigotos e sem nenhuma mutação. Os autores concluíram que a análise molecular poderia ajudar na definição das formas clínicas da doença, pela boa correlação genótipo-fenótipo. Poderia também esclarecer o diagnóstico e encurtar o tempo de acompanhamento de crianças falso-positivas com níveis persistentemente elevados de 17-OHP. Com isso, os autores enfatizaram que os custos da análise molecular devem ser avaliados em relação aos custos do acompanhamento dos casos falso-positivos<sup>51</sup>.

No nosso meio, tanto a utilização da espectrometria de massa em *tandem* como da análise molecular em larga escala ainda são inviáveis, pelo alto custo. Outras estratégias devem ser utilizadas, portanto, para reduzir a taxa de falso-positivos.



### 6.3.4 Fatores relacionados à ocorrência de falso-positivos

A compreensão dos fatores relacionados à ocorrência dos falso-positivos, ou seja, dos fatores relacionados ao aumento dos níveis de 17-OHP, é fundamental para o estabelecimento de estratégias que minimizem esse achado no futuro.

#### 6.3.4.1 Fatores gerais

Houve predominância de 62% de crianças do sexo masculino entre os casos falso-positivos. Já foi descrito anteriormente que recém-nascidos do sexo masculino possuem níveis de 17-OHP significativamente mais elevados do que recém-nascidos do sexo feminino. Esse achado poderia ser responsável por maior número de casos falso-negativos em meninas e de falso-positivos em meninos. O dimorfismo sexual poderia ser devido às diferenças nas funções adrenal e gonadal entre meninos e meninas ao nascimento<sup>76,117</sup>. Ballerini *et al.* demonstraram que os níveis de 17-OHP são mais elevados nos meninos devido à presença de maior quantidade de esteroides interferentes. Quando se utilizou um método de radioimunoensaio com extração prévia desses interferentes, os níveis de 17-OHP não foram estatisticamente diferentes entre os sexos<sup>114</sup>.

A maioria das crianças falso-positivas estudadas (76%) apresentava história de intercorrência perinatal. Isso confirma os níveis de 17-OHP mais elevados em crianças estressadas (doentes), provavelmente pelo aumento do ACTH que se verifica nessas situações. A principal intercorrência relatada foi a prematuridade (80,8%). Além do estresse, as outras causas de aumento dos níveis de 17-OHP em crianças prematuras relacionam-se à imaturidade adrenal e renal e aos esteroides conjugados interferentes<sup>34</sup>. Outras intercorrências como sepse, icterícia, asfíxia, além de intercorrências exclusivamente maternas como hipertensão e diabetes gestacional, também foram relatadas e possivelmente estão relacionadas à triagem positiva.

Recente pesquisa avaliou os níveis de 17-OHP logo após o nascimento de crianças prematuras (25-33 semanas de idade gestacional) com história materna de intercorrência (infecção amniótica e pré-eclâmpsia). O objetivo foi comparar os níveis de 17-OHP em situação de estresse agudo (infecção amniótica) *versus* crônico (pré-eclâmpsia). A casuística incluiu 90 crianças prematuras. Os níveis de 17-OHP foram significativamente mais altos nas crianças nascidas de mães com pré-eclâmpsia em relação às crianças nascidas de mães com infecção amniótica. Os níveis de 17-OHP foram ainda mais altos

quando as crianças apresentavam crescimento intrauterino restrito. A administração antenatal de corticosteroide e o tipo de parto não influenciaram significativamente os níveis de 17-OHP. Os autores concluíram que situação de estresse com duração relativamente longa, como a pré-eclâmpsia, leva a significativo aumento nos níveis de 17-OHP em crianças prematuras. Concluíram, também, que a 17-OHP pós-natal poderia ser considerada uma medida da gravidade do estresse intrauterino<sup>57</sup>.

Entre as crianças falso-positivas sem relato de intercorrência perinatal, não foi encontrada justificativa alguma para os níveis mais elevados de 17-OHP, a não ser a possibilidade de reação cruzada com esteroides interferentes pelo método do exame.

#### 6.3.4.2 Fatores laboratoriais

Das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG, 85% já apresentaram normalização da 17-OHP, recebendo alta. O acompanhamento dessas crianças foi longo (mediana de 17 meses de vida à alta), sendo que a mediana do tempo de normalização da 17-OHP sérica foi significativamente mais elevada do que da androstenediona sérica. A principal hipótese para esse evento foi o método utilizado para dosagem da 17-OHP sérica (radioimunoensaio sem extração prévia). Não foi encontrado estudo comparando o tempo de normalização dos dois esteroides em crianças falso-positivas.

A dosagem da 17-OHP sérica utilizando métodos de radioimunoensaio (RIA) é frequentemente afetada por reações cruzadas com esteroides estruturalmente semelhantes presentes no plasma do recém-nascido. A zona adrenal fetal produz níveis elevados de sulfato de 17-hidroxipregnenolona, que possui epítomos imunorreativos semelhantes à molécula de 17-OHP. Esse esteroide interferente causa aumento nos valores de 17-OHP medidos durante os primeiros meses de vida, que não devem ser ignorados. Uma etapa de extração com solventes orgânicos, anterior ao procedimento de radioimunoensaio, provoca diminuições marcantes nos níveis séricos de 17-OHP, eliminando esses compostos hidrossolúveis interferentes. Até qual idade esse procedimento deve ser realizado ainda é controverso<sup>46,115,116</sup>. Ballerini *et al.* encontraram esteroides interferentes em concentrações significativas no período neonatal e até um ano de idade em ambos os sexos<sup>114</sup>.

Ensaio altamente específicos e sensíveis (CL-EMEM) foram desenvolvidos para a quantificação da 17-OHP, mas essa tecnologia possui alto custo e quase sempre não é disponível em laboratórios comuns<sup>69</sup>.

Neste trabalho, quando foram comparados níveis de esteroides adrenais entre as crianças falso-positivas e doentes, observou-se que as crianças falso-positivas apresentaram mediana de 17-OHP em papel-filtro significativamente mais baixa do que as crianças doentes, mas, apesar disso, houve sobreposição de valores de 17-OHP entre esses dois grupos. Com isso, fica claro que essa primeira avaliação da 17-OHP, por si só, não foi capaz de diferenciar indivíduos normais de doentes e que o acompanhamento clínico-laboratorial subsequente foi essencial para a confirmação diagnóstica. Esse achado está de acordo com a afirmativa de que nenhum teste de triagem possui a intenção de ser diagnóstico. Apenas identifica crianças sob risco de ter uma doença e que devem ser avaliadas<sup>118</sup>.

Dados de literatura não apresentam consenso. Janzen *et al.* (2007) compararam níveis de 17-OHP, androstenediona e 21-deoxicortisol entre crianças prematuras e crianças com HAC, dosados em papel-filtro pelo método de CL-EMEM. O 21-deoxicortisol foi o esteroide com melhor capacidade de discriminar crianças com HAC de prematuras, mas não houve diferença dos outros esteroides entre os dois grupos<sup>67</sup>.

Outros autores relataram valores de 17-OHP discriminatórios entre falso-positivos e doentes<sup>47</sup>, na segunda amostra em papel-filtro analisada pelo método DELFIA®.

De maneira semelhante aos nossos achados em papel-filtro, os níveis de 17-OHP séricos foram significativamente mais baixos entre as crianças falso-positivas em relação às doentes, mas também houve sobreposição de valores. Já as medianas da androstenediona e da testosterona não foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos.

Observou-se, portanto, que apenas níveis muito elevados de 17-OHP discriminaram indivíduos falso-positivos de doentes e que para o diagnóstico da HAC foi necessário o seguimento clínico-laboratorial das crianças.

#### 6.3.4.3 Fatores genéticos

A possibilidade de valores mais elevados de 17-OHP em recém-nascidos heterozigotos leva à preocupação em relação ao número de casos falso-positivos entre essas crianças<sup>50</sup>.

Apenas 16% das crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG foram submetidas à análise molecular do gene CYP21A2, pelo alto custo do procedimento. Entre as crianças analisadas, foi encontrada elevada frequência de heterozigose (33,3%). Estima-

se que, na população geral, as frequências de indivíduos portadores de mutações associadas às formas clássicas e não clássicas de HAC sejam de cerca de 1,5 e 10%, respectivamente<sup>6,119</sup>.

Embora não tenha sido registrada diferença nos níveis de 17-OHP entre crianças falso-positivas heterozigotas e não heterozigotas, foi reduzido o número de crianças avaliadas. Não se pode, portanto, afastar a possibilidade de que heterozigose seja um fator que possa ter contribuído para o aumento da taxa de falso-positivos nesta investigação.

Indivíduos heterozigotos para o gene CYP21A2 têm níveis de 17-OHP mais elevados após teste de estímulo com ACTH, quando comparados com indivíduos não portadores de mutação<sup>20</sup>. Entretanto, não foram encontradas publicações sobre níveis basais de 17-OHP mais elevados nessas crianças.

Nenhuma criança falso-positiva foi detectada com a forma não clássica da doença, embora essa possibilidade não possa ser afastada.

### **6.3.5 Crianças ainda em observação clínica em 20/07/2010**

Quarenta e oito crianças falso-positivas (15%) ainda permaneciam em observação clínica na época da análise dos dados, com idade, à última avaliação, de  $24 \pm 6$  meses. As razões pelas quais essas crianças persistiam com níveis séricos elevados de 17-OHP não são conhecidas, mas são várias as possibilidades.

Não se encontrou alta porcentagem de prematuridade entre essas crianças. Além disso, elas já estavam, em média, com dois anos de idade e não seria esperado que prematuridade ainda estivesse interferindo nos níveis de 17-OHP. Recente pesquisa evidenciou níveis mais elevados de 17-OHP em crianças prematuras quando comparadas com crianças normais a termo, apenas até os dois meses de idade<sup>114</sup>.

Não seria esperado, também, que os esteroides da zona adrenal fetal ainda estivessem presentes em quantidades significativas e interferindo na dosagem da 17-OHP, embora seja controverso até qual idade isso aconteça<sup>46,115,116</sup>.

Como apenas quatro dessas crianças foram submetidas à análise molecular do gene CYP21A2 no início do projeto-piloto, não foi possível descartar a possibilidade da forma não clássica da doença ser um fator determinante.

Poucos trabalhos descreveram o resultado do acompanhamento de crianças com triagem alterada para HAC, níveis séricos persistentemente elevados de 17-OHP e não doentes (falso-positivos)<sup>120,121</sup>.

Cavarzere *et al.* avaliaram 15 crianças com esse quadro denominado hiper-17-OH progesteronemia transitória. Todas as crianças apresentaram análise molecular negativa do gene CYP21A2. Algumas apresentaram níveis elevados de 17-OHP após teste de estímulo com ACTH realizado no primeiro mês de vida. Os níveis de 17-OHP séricos normalizaram-se espontaneamente até o sexto mês de vida. Os autores discutiram as possíveis causas para a persistência dos níveis de 17-OHP elevados nessas crianças: prematuridade, estresse perinatal, reação cruzada com outros esteroides pelo radioimunoensaio e imaturidade enzimática adrenal, que poderia estar presente até mesmo em crianças nascidas a termo. Os autores concluíram que nenhuma investigação adicional é necessária nesses recém-nascidos se os níveis de 17-OHP séricos estiverem em queda e, ainda, que testes confirmatórios como análise molecular ou teste de estímulo com ACTH são necessários apenas se ocorrer aparecimento de algum sintoma da doença<sup>120</sup>.

Os custos relacionados ao acompanhamento das crianças com triagem positiva não são apenas econômicos, mas também psicológicos. No presente projeto-piloto, o diagnóstico incerto dessas crianças tem sido responsável por algumas vivências negativas. Como os níveis de 17-OHP séricos se mostram flutuantes, o tempo de acompanhamento até a alta pode ser longo. Essa situação pode gerar acentuada ansiedade não apenas nas famílias, mas também em toda a equipe médica e perdura até a confirmação ou exclusão diagnóstica de cada criança.

Não foi encontrado na literatura estudo relatando tempo de acompanhamento tão longo de crianças com triagem positiva e níveis persistentemente elevados de 17-OHP. É desejável, portanto, que essas crianças sejam submetidas à análise molecular do gene CYP21A2 e ao teste de estímulo com ACTH para definição diagnóstica.

### **6.3.6 Análise da viabilidade de implantação do programa de triagem para HAC em Minas Gerais**

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de implantação de um programa de triagem para HAC em Minas Gerais. Um dos grandes entraves no planejamento desses programas é o manejo dos falso-positivos. Por esse motivo, estudou-

se a distribuição dos valores de 17-OHP na população triada em busca de pontos de corte mais adequados.

Entre as crianças com peso ao nascimento informado, ficou comprovada a relação inversa entre peso ao nascimento e níveis de 17-OHP. Nas crianças com muito baixo peso ao nascimento (<1.500 g), os valores de 17-OHP, além de mais elevados, mostraram mais variância, presumivelmente devido à alta incidência de estresse neonatal nesse grupo. Esses achados estão em concordância com diversos estudos<sup>50,61</sup> e reforçam a importância do ajuste dos pontos de corte para as crianças com baixo peso ao nascimento ou prematuras, possibilitando controlar suas taxas de reconvocação.

Na Argentina, avaliou-se a influência da idade gestacional e do peso ao nascimento nos níveis de 17-OHP e seu impacto sobre as taxas de reconvocação no programa de triagem neonatal para HAC. Foram analisados os níveis de 17-OHP de 1.313 amostras de recém-nascidos prematuros (23-36 semanas) e 1.500 recém-nascidos termo (>37 semanas), agrupados de acordo com a idade gestacional e o peso ao nascimento. Os autores encontraram correlação inversa entre peso ao nascimento, idade gestacional e níveis de 17-OHP. Com a utilização de um ponto de corte único para a 17-OHP, a taxa de reconvocação entre os recém-nascidos com baixo peso e prematuros era de 25%. Quando os pontos de corte foram ajustados calculando-se o percentil 99 da 17-OHP para cada intervalo de idade gestacional ou peso ao nascimento, apurou-se significativa redução da taxa de reconvocação. A taxa de reconvocação entre as crianças com baixo peso ou prematuras diminuiu para 1,2% quando o ponto de corte foi ajustado de acordo com a idade gestacional e para 1,4% quando foi ajustado de acordo com o peso ao nascimento<sup>58</sup>.

Pontos de corte adequados na triagem neonatal para HAC devem possibilitar taxa de reconvocação aceitável em relação à prevalência da doença, sem perda de sensibilidade<sup>24,62</sup>. Para isso, devem ser ajustados acima do percentil 99 e de acordo com a idade gestacional ou peso ao nascimento<sup>2</sup>. Deve-se levar em consideração que um ensaio quantitativo não possui máximas sensibilidade e especificidade diagnósticas simultaneamente. A utilização de um ponto de corte único que permita taxa de reconvocação viável para crianças prematuras levaria à perda de sensibilidade para crianças não prematuras.

Allen *et al.* adotaram como ponto de corte para resultado “definitivamente” anormal o valor da média de 17-OHP + 4 DP. Valor entre +3 e +4 DP da média era considerado “possivelmente” anormal e a criança era convocada por carta para nova amostra. Essa estratégia foi utilizada para quatro categorias de peso (< 1.300 g, 1.300-

1.699 g, 1.700-2.199 g e  $\geq$  2.200 g) e se mostrou interessante, levando à taxa de reconvocação e VPP viáveis<sup>61</sup>.

No presente estudo, a taxa de reconvocação foi de 1,56% da população triada. Essa taxa de reconvocação foi considerada elevada, mas compatível com a descrita na literatura (1 a 3%) quando os pontos de corte não são adequadamente ajustados de acordo com a idade gestacional ou peso ao nascimento<sup>50,82</sup>.

Apenas 3% da população triada era sabidamente de baixo peso ou prematura e foi triada pelo ponto de corte ajustado de 160 nmol/L. A taxa de reconvocação foi elevada para essas crianças (11%), o que demonstra que esse ponto de corte não estava adequado. Além disso, considerando que em 2007 a taxa de prematuridade em Minas Gerais foi em torno de 7,5%<sup>122</sup>, é possível concluir que muitas crianças prematuras foram triadas pelo ponto de corte de 80 nmol/L.

A triagem para HAC apresenta o mais baixo VPP entre os programas de triagem neonatal<sup>123</sup>. Os VPPs relatados na literatura têm sido muito variáveis, já que são influenciados pela incidência encontrada da doença e pela definição de falso-positividade utilizada. Na nossa pesquisa, apenas crianças convocadas para consulta médica foram consideradas positivas à triagem. O VPP encontrado foi de 2,1%. Entretanto, a chance de uma criança nascida a termo, sem baixo peso, com níveis de 17-OHP superiores a 160 nmol/L ser doente foi elevada (20%).

Considerando as taxas de reconvocação do projeto-piloto e analisando os dados do percentil 99 da 17-OHP da população estudada, foi feita a proposta de novos pontos de corte e reanalisaram-se os resultados obtidos.

Foi possível perceber que, com a utilização dos dois novos pontos de corte (110 nmol/L para crianças com peso ao nascimento  $\geq$  2.500 g e 220 nmol/L para crianças com peso  $<$  2.500 g), a taxa de reconvocação geral diminuiria de 1,6 para 0,5%. Entretanto, a taxa de reconvocação ainda seria de 5% entre as crianças com baixo peso ao nascimento. Com isso, fica evidente a importância de separar as crianças em vários grupos de peso e estabelecer pontos de corte específicos para cada um deles.

Utilizando apenas os dois novos pontos de corte, a taxa de falso-positivos diminuiria de 0,31 para 0,075% (76% de redução), não haveria perda de sensibilidade e ocorreria aumento de quatro vezes no VPP (de 2,1 para 8%). Já se fossem utilizados os novos pontos de corte para os quatro grupos de peso, a taxa de falso-positivos seria de 0,054% (28% menos em relação à abordagem anterior), também não haveria perda de sensibilidade e o aumento no VPP seria de cinco vezes (de 2,1 para 10,8%). Portanto,

certamente, haveria ganhos com a estratégia de vários pontos de corte baseados no peso dos recém-nascidos.

Olgemöller *et al.* (2003)<sup>50</sup>, na região alemã de Baviera, propuseram triagem baseada em cinco faixas de peso ao nascimento: a) <1.000 g; b) 1.000-1.500 g; c) 1.500-2.000 g; d) 2.000-2.500 g; e) >2.500 g. Foi realizada também a categorização conforme a idade (dias de vida) à coleta para crianças com peso ao nascimento acima de 2.500 g: a) 0-1 dia de vida; b) 2-3 dias de vida; c)  $\geq$  quatro dias de vida. Anteriormente a triagem utilizava três pontos de corte e era baseada em apenas duas faixas de peso ao nascimento (<2.000 g,  $\geq$ 2.000 g com 0-3 dias de vida e  $\geq$ 2.000 g com  $\geq$ quatro dias de vida). Com a nova estratégia, a especificidade foi de 99,3%, a taxa de reconvocação total diminuiu de 1,12% para 0,73% e o VPP aumentou de 0,84% para 1,29%.

É relevante considerar entretanto, que estratégias mais complexas para Minas Gerais, estado populoso e com regiões diversificadas, devem dificultar o desenvolvimento do processo.

Apesar de vários estudos terem demonstrado que a idade gestacional é melhor preditor da concentração de 17-OHP do que o peso ao nascimento<sup>62</sup>, sua utilização no estado de Minas Gerais é pouco viável, já que é um dado de difícil obtenção. No presente estudo, a utilização dos dois novos pontos de corte baseados na idade gestacional (110 nmol/L para recém-nascidos a termo e 220 nmol/L para recém-nascidos prematuros) levaria a taxa de falso-positivos semelhante à encontrada se os pontos de corte fossem baseados no peso ao nascimento (0,07%). Além disso, não ocorreria a detecção de criança prematura com HAC forma virilizante simples.

A melhor estratégia para obtenção de segurança e praticidade na realização da triagem para HAC continua em debate; a viabilidade de utilização de vários pontos de corte para a 17-OHP precisará ser estudada com muita atenção para o estado de Minas Gerais.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os programas de triagem neonatal têm como objetivo evitar mortes e sequelas preveníveis com base no diagnóstico precoce de doenças que, de outra forma, passariam despercebidas no período neonatal. Constitui medida importante de saúde pública.

As doenças incluídas nos programas de triagem variam muito entre os diversos países e regiões do mundo, na dependência de especificidades epidemiológicas, bem como das prioridades de políticas públicas de saúde.

Dados dos programas de triagem neonatal para HAC realizados até o momento indicam claramente seus benefícios, principalmente em relação às complicações graves como a crise de perda de sal e o registro civil incorreto de meninas. Reduz significativamente o tempo de diagnóstico das crianças afetadas pela doença, diminuindo morbimortalidade. Nos países em desenvolvimento, onde o diagnóstico clínico precoce da doença ainda é muito deficiente, a triagem salva vidas.

A razão para a resistência em adicionar a HAC aos programas de triagem refere-se ao fato de que os ensaios imunológicos utilizados estão associados a alta taxa de falso-positivos, devido a fatores fisiológicos e às reações cruzadas com outros esteroides semelhantes à 17-OHP, especialmente em recém-nascidos prematuros e estressados (doentes). Este projeto piloto mostrou que o ajuste adequado dos pontos de corte para o peso ao nascimento ou idade gestacional pode ser utilizado com sucesso para controlar as taxas de reconvocação dessas crianças.

Alguns pontos negativos também devem ser considerados. O manejo e o acompanhamento adequados das crianças com triagem positiva para HAC, assintomáticas e que apresentam níveis pouco elevados de 17-OHP é ainda uma incógnita. Atualmente, essa população vem sendo submetida a acompanhamento clínico prolongado em diversos programas, com conseqüente estresse psicológico para as famílias.

A dosagem da 17-OHP sérica é considerada ferramenta útil para o diagnóstico bioquímico da HAC por 21-OHD em crianças com triagem positiva. Idades gestacional e cronológica, sexo e procedimentos de extração para sua dosagem são fatores importantes que devem ser levados em consideração quando se quer avaliar a função adrenal dessas crianças. Valores de referência confiáveis para esse esteróide devem ser estabelecidos.

Outra questão importante é que, com a implantação da triagem, pode haver tendência ao supertratamento de casos afetados pelas formas leves da HAC, com consequências maléficas em longo prazo. Esse fato pode ser devido à dificuldade em se estabelecer a gravidade da doença nos primeiros meses de vida.

Apesar de todas essas considerações, não há discordância a respeito da forma clássica da HAC ser doença importante que deve ser identificada e tratada o mais precocemente possível. Por isso, a triagem neonatal tem sido recomendada e implantada de maneira crescente em todo o mundo.

Os resultados desta pesquisa trouxeram alguns subsídios para discussão acerca da implantação ou não da triagem para HAC no estado de Minas Gerais e possibilitaram amplo aprendizado.

Vários fatores devem ser considerados ao se avaliar a inclusão do teste de triagem neonatal para HAC no nosso estado, tais como: baixo custo de incorporar mais uma doença à triagem neonatal já estabelecida para outras enfermidades, dificuldade de reconhecimento da doença pela classe médica em população de pacientes não triados, com risco de morte dessas crianças, além de baixo custo e efetividade do tratamento.

Acredita-se que os resultados encontrados - incidência relativamente alta da doença (superior a 1:20.000), com perspectiva de redução significativa da mortalidade da forma perdedora de sal - justificam a implantação da triagem neonatal para HAC no estado de Minas Gerais. Os parâmetros obtidos como boa sensibilidade e especificidade do teste com perspectiva de redução da taxa de reconvocação e melhora do VPP demonstram a viabilidade da triagem e a possibilidade de ótima relação custo-eficácia do programa.

## 8 CONCLUSÕES

- Foi encontrada incidência de 1:19.927 para a forma clássica da HAC no estado de Minas Gerais.
- Oito crianças doentes foram detectadas (5 meninas), 75% com a forma perdedora de sal da doença. As medianas da 17-OHP em papel-filtro e sérica foram 250 nmol/L (196-660) e 2.835 ng/dL (2.160-4.180), respectivamente.
- Em 50% das crianças não houve suspeita clínica da doença e o diagnóstico foi atribuído inteiramente à triagem. Apesar dos esforços, não foi possível evitar hiponatremia em algumas crianças, pela demora no início do tratamento. Não houve registro civil incorreto de nenhuma menina afetada virilizada.
- A determinação da 17-OHP pelo ensaio UMELISA 17-OH Progesterona NEONATAL® foi considerado um teste de triagem eficaz, por permitir a detecção de crianças em risco de HAC, sem casos falso-negativos detectados até o momento. As sensibilidade e especificidade do ensaio foram de 100 e 99,7%, respectivamente.
- A taxa de falso-positivos encontrada foi 0,31% e o VPP 2,1%. Os casos falso-positivos foram atribuídos, em grande parte, à prematuridade. Intercorrências perinatais, sexo masculino e heterozigose também foram possíveis fatores associados à ocorrência dos falso-positivos. O tempo de acompanhamento dessas crianças, até normalização completa da 17-OHP, foi longo.
- Os pontos de corte para a 17-OHP empregados na triagem (80 e 160 nmol/L) mostraram-se inadequados, levando à alta taxa de reconvocação geral (1,6%) e entre crianças com baixo peso ao nascimento ou prematuras (11%). Com a utilização dos novos pontos de corte propostos, baseados no percentil 99 da 17-OHP para quatro categorias de peso, ocorreria diminuição de 82% na taxa de falso-positivos, sem prejuízo da sensibilidade e com aumento de cinco vezes no VPP.

- A adoção dos novos pontos de corte foi considerada medida custo-efetiva que viabiliza a implantação do programa de triagem neonatal para HAC no estado de Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

1. Pang S, Clark A. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *J Med Screen* 1993; 2:105-39.
2. Van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:U71-U75.
3. Van der Kamp HJ, Noordam K, Elvers B, Van Baarle M, Otten BJ, Verkerk PH. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in The Netherlands. *Pediatrics* 2001; 108:1320-1324.
4. 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.
5. 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; 55:413-20.
6. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21:245-91.
7. Mattozo M, Souza LC. Triagem neonatal em Santa Catarina: relato histórico, aspectos fisiopatológicos e métodos de análise realizados pelo Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Estado. *NewsLab* 2005; 68:84-102.
8. 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.
9. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Disponível em <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CYP21A2>, 2008.
10. White PC, Tusie-Luna MT, New MI, Speiser PW. Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum Mutat* 1994; 3:373-8.
11. Mello MP, Bachega TA, Santos MC, Mermejo LM, Castro M. Molecular bases of congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(4):457-477.
12. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009; 38(4):699-718.
13. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003; 349(8):776-88.

14. Prader A, Gurtner HP. The syndrome of male pseudohermaphroditism in congenital adrenocortical hyperplasia without overproduction of androgens (adrenal male pseudohermaphroditism). *Helv Paediatr Acta* 1955; 10:397-412.
15. Woelfle J, Hoepffner W, Sippell WG, Brämswig JH, Heidemann P, Deiss D. *et al.* Complete virilization in congenital adrenal hyperplasia: clinical course, medical management and disease-related complications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 56:231-8.
16. Shulman DI, Palmer MR, Kemp SF. Lawson Wilkins drug and therapeutics committee. adrenal insufficiency: still a cause of morbidity and death in childhood. *Pediatrics* 2007; 119:484-494.
17. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005; 365:2125-36.
18. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT. *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 90(2):584-95.
19. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D. *et al.* Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(1):207-13.
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. Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttann F, Vexiau P, Couillin P. *et al.* Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:659-67.
22. 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.
23. Honour JW, Torresani T. Evaluation of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2001; 55(4):206-11.
24. Therrell Jr BL, 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; 101:583-90.
25. Thilen A, Nordenström A, Hagenfeldt L, von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics* 1998; 101(4):E11.
26. Kaye CI. Committee on Genetics, Accurso F, La Franchi S, Lane PA, Northrup H. *et al.* Introduction to the newborn screening fact sheets. *Pediatrics* 2006; 118(3):1304-12.

27. Kovács J, Votava F, Heinze G, Sólyom J, Lebl J, Pribilincová Z. *et al.* Middle European Workshop on Paediatric Endocrinology-Congenital Adrenal Hyperplasia Study Group. Lessons from 30 years of clinical diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia in five middle European countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(7):2958-64.
28. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30:15-30.
29. Schreiner F, Brack C, Salzgeber K, Vorhoff W, Woelfle J, Gohlke B. False negative 17-hydroxyprogesterone screening in children with classical congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Pediatr* 2008; 167:479-81.
30. Brasil. Portaria Ministerial GM/MS de 06 de junho de 2001. *Diário Oficial da União*, 2001.
31. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice of screening for disease. *Public Health Papers*, n. 34. Geneva: World Health Organization, 1968.
32. White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5(9):490-8.
33. Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, Ritzen EM, Sippell WG, Speiser PW. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res* 2002; 58:188-95.
34. Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in North-Eastern Italy: a report three years into the program. *Horm Res* 2005; 63(4):180-6.
35. 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.
36. 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.
37. Lebovitz RM, Pauli RM, Laxova R. Delayed diagnosis in congenital adrenal hyperplasia. Need for newborn screening. *Am J Dis Child* 1984; 138:571-3.
38. Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PR. *et al.* Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153:1272-1278.
39. Nass R, Baker S. Learning disabilities in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Child Neurol* 1991; 6(4):306-12.

40. Donaldson MD, Thomas PH, Love JG, Murray GD, McNinch AW, Savage DC. Presentation, acute illness, and learning difficulties in salt wasting 21-hydroxylase deficiency. *Arch Dis Child* 1994; 70(3):214-8.
41. Speiser PW. Prenatal and neonatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007; 68(5):90-2.
42. Gonzalez RR, Mäentausta O, Solyom J, Vihko R. Direct solid-phase time-resolved fluoroimmunoassay of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in serum and dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 1990; 36:1667-1672.
43. Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8(4):349-63.
44. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 1997; 18(3):378-403.
45. 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; 112:473-80.
46. Wong T, Shackleton CHL, Covey TR, Ellis G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem* 1992; 38:1830-7.
47. Cardoso CBMA, Fonseca AA, Oliveira MFS, Pereira BB, Guimarães MM. Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita: experiência do estado do Rio de Janeiro. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(1):112-9.
48. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inher Metab Dis* 2007; 30(4):430-8.
49. Papendieck LG, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bergadá C. Congenital adrenal hyperplasia and early newborn screening: 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP) during the first days of life. *J Med Screen* 1998; 5:24-6.
50. 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.
51. Silveira EL, Elnecave RH, 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; 76(6):503-10.
52. Nordenström 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; 108(4):E68.



53. Hingre RV, Gross SJ, Hingre KS, Mayes DM, Richman RA. Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:266-70.
54. Lee MM, Rajagopalan L, Berg GJ, Moshang Jr T. Serum adrenal steroid concentrations in premature infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:1133-6.
55. Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of bloodspot 17 alpha-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:546-551.
56. Nomura, S. Immature adrenal steroidogenesis in preterm infants. *Early Hum Dev* 1997; 49:225-233.
57. Ersch J, Beinder E, Stallmach T, Bucher HU, Torresani T. 17-Hydroxyprogesterone in premature infants as a marker of intrauterine stress. *J Perinat Med* 2008; 36:157-60.
58. Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G, Bergadá C. *et al.* Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia: adjustments to the recall protocol. *Horm Res* 2001; 55:271-7.
59. Doerr HG, Sippell WG, Versmold HT, Bidlingmaier F, Knorr D. Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infant: longitudinal study during first week of life. *Pediatr Res* 1988; 23:525-526.
60. Votava F, Torok D, Kovacs J, Moslinger D, Baumgartner-Parzer SM, Solyom J. *et al.* Congenital adrenal hyperplasia (MESPE-CAH) study group: estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 869-874.
61. 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; 130:128-133.
62. 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; 90:3904-3907.
63. Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)-ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17alpha-hydroxyprogesterone (17-OHP) values. *Steroids* 2009;74(8):662-5.
64. Mitchell ML, Hermos RJ. Cortisol in dried blood screening specimens with raised 17-hydroxyprogesterone and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48:757- 560.
65. Nordenström A, Thilén 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; 84:1505-1509.

66. 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; 51:298-304.
67. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U. *et al.* Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2581-9.
68. Wudy SA, Wachter UA, Homoki J, Teller WM. 17 alpha-hydroxyprogesterone, 4androstenedione, and testosterone profiled by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry in plasma of children. *Pediatr Res* 1995; 38:76-80.
69. Wudy SA, Hartmann M, Svoboda M. Determination of 17- hydroxyprogesterone in plasma by stable isotope dilution/benchtop liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Horm Res* 2000; 53:68-71.
70. Lai CC, Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, Lin WD, Lee CC. Rapid screening assay of congenital adrenal hyperplasia by measuring 17 alpha-hydroxyprogesterone with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:20-5.
71. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M. *et al.* Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50:621-5.
72. 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; 89:3687-93.
73. Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the falsepositive rate in newborn screening by implementation of Ms/Ms-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004–2007). *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:585-592.
74. Waisbren SE, Albers S, Amato S, Ampola M, Brewster TG, Demmer L. *et al.* Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress. *JAMA* 2003; 290:2564-72.
75. Carroll AE, Downs SM. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* 2006; 117:S287-S295.
76. Varness TS, Allen DB, Hoffman GL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia has reduced sensitivity in girls. *J Pediatr* 2005; 147:493-498.
77. Gatelais F, Berthelot J, Beringue F, Descamps P, Bonneau D, Limal JM. *et al.* Effect of single and multiple courses of prenatal corticosteroids on 17-hydroxyprogesterone levels: implication for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res* 2004; 56:701-705.

78. King JL, Naber JM, Hopkin RJ, Repaske DR, Bailey L, Leslie ND. *et al.* Antenatal corticosteroids and newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001; 155:1038-1042.
79. Rohrer TR, Gassmann KF, Pavel ME, Dörr HG. Pitfall of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Biol Neonate* 2003; 83:65-68.
80. Gleeson HK, Wiley V, Wilcken B, Elliott E, Cowell C, Thonsett M. *et al.* Two-year pilot study of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New South Wales compared with nationwide case surveillance in Australia. *J Paediatr Child Health* 2008; 44(10):554-9.
81. Eyskens F. Screening for inborn errors of metabolism; the experience in the province of Antwerp [thesis]. Antwerp, Belgium: University of Antwerp; 1997.
82. Torresani T, Gruters A, Scherz R, Burckhardt JJ, Harras A, Zachmann M. Improving the efficacy of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by adjusting the cut-off level of 17-hydroxyprogesterone to gestational age. *Screen* 1994; 3:77-84.
83. Cartigny-Maciejewski M, Guilley N, Vanderbecken S, Gondé S, Stuckens C, Ponté C. *et al.* Neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Lille experience 1980–1996. *Arch Pediatr* 1999; 6:151-158.
84. 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; 98:362-367.
85. Larsson A, Thilen A, Hagenfeldt L, von Dobeln U, Guthenberg C. Screening of half a million Swedish newborn infants for congenital adrenal hyperplasia. *Screen* 1992; 1:159-166.
86. Bachege TA, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Mello MP. *et al.* Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48(5):697-704.
87. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32:338-43.
88. American Academy of Pediatrics. Newborn Screening fact sheets. *Pediatrics* 1996; 98:467-72.
89. Carvalho TM, Santos HP, Santos IC, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:615.
90. Souza CF, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc Saúde Coletiva* 2002; 7:129-37.

91. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal / Brasil. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
92. American College of Medical Genetics. Maternal and Child Health Bureau. Health Resources and Services Administration. US Department of Health and Human Services. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. 2005. <http://www.acmg.net//AM/Template.cfm?Section=Home3> (acessado em 03/10/2010).
93. [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061) (acessado em 03/10/2010).
94. Aguiar MJ. Genetic services and research in the state of Minas Gerais, Brazil. *Community Genet.* 2004; 7:117-20.
95. Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81:240-4.
96. <http://www.nupad.medicina.ufmg.br/apresentacao/apresentacao.html> (acessado em 04/10/2010).
97. Leão LL, Aguiar MJ. Newborn screening: what pediatricians should know. *J Pediatr (Rio J)* 2008; 84(4 Suppl):S80-90.
98. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-817.
99. Wilcken B. Ethical issues in newborn screening and the impact of new technologies. *Eur J Pediatr* 2003; 162:S62-6.
100. Arn PH. Newborn screening: current status. *Health Aff (Millwood)* 2007; 26:559-66.
101. Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:439-44.
102. UK Newborn Screening Programme Centre. <http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk>. (acessado em 06/10/10).
103. Pollitt RJ. Introducing new screens: why are we all doing different things? *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30(4):423-9.
104. 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* 1997; 113:170-178.
105. Maeda M, Arakawa H, Tsuji A, Yamagami Y, Isozaki A, Takahashi T. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for 17 alpha-hydroxyprogesterone in dried blood spotted on filter paper. *Clin Chem* 1987; 33(6):761-4.

106. González EC, Marrero N, Pérez PL, Frómata A, Zulueta O, Herrera D. *et al.* An enzyme immunoassay for determining 17alpha-hydroxyprogesterone in dried blood spots on filter paper using an ultramicroanalytical system. *Clin Chim Acta* 2008; 394(1-2):63-6.
107. Pang S, Shook MK. Current status of neonatal screening for CAH. *Curr Opin Pediatr* 1997; 9:419-423.
108. Pang S. International Newborn Screening (NBS) Collaborative Study on 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia frequency, phenotype variability and effectiveness of NBS. Joint Meeting of Pediatric Academic Societies/American Academy of Pediatrics. May 5, 2003. Seattle, WA [abstract]. *Pediatr Res* 2003; 52:155.
109. Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology. Procedure for neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res* 2001; 55(4):201-5.
110. [http://www.sbtn.org.br/pg\\_triag\\_testepezinho.htm](http://www.sbtn.org.br/pg_triag_testepezinho.htm) (acessado em 20/09/2010).
111. [http://www.nupad.medicina.ufmg.br/triagem/triagem\\_neonatal.html](http://www.nupad.medicina.ufmg.br/triagem/triagem_neonatal.html) (acessado em 09/10/10).
112. [http://www.medicina.ufmg.br/nupad/download/02\\_Programa\\_de\\_Triagem.pdf](http://www.medicina.ufmg.br/nupad/download/02_Programa_de_Triagem.pdf) (acessado em 09/10/10).
113. Janzen N, Sander S, Terhardt M, Peter M, Sander J. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 861(1):117-22.
114. Ballerini MG, Chiesa A, Scaglia P, Gruñeiro-Papendieck L, Heinrich JJ, Ropelato MG. 17alpha-hydroxyprogesterone and cortisol serum levels in neonates and young children: influence of age, gestational age, gender and methodological procedures. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010; 23(1-2):121-32.
115. Makela SK, Ellis G. Nonspecificity of a direct 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassay kit when used with samples from neonates. *Clin Chem* 1988; 34(10):2070-5.
116. Lee A, Ellis G. Serum 17 alpha-hydroxyprogesterone in infants and children as measured by a direct radioimmunoassay kit. *Clin Biochem* 1991; 24(6):505-11.
117. 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; 62(5):605-9.
118. ISNS Standing Committee on Quality Assurance Lexicon of Terms to be used in newborn screening. <http://isns.napoleon.ch/upload/dokumente/Lexicon8.pdf> (acessado em 17/9/2010).

119. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37(4):650-67.
120. 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; 161(2):285-92.
121. Mizuno H, Ohro Y, Sugiyama Y, Ito T, Hasegawa T, Homma K. *et al.* *Horm Res.* Transient hyper-17-OHPnemia unrelated to cross-reactions with residual fetal adrenal cortex products. 2004; 61(5):242-5.
122. Datasus. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos - SINASC <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>.
123. 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; 66(2):230-5.

## APÊNDICES E ANEXOS

### Apêndice A - Ficha de Atendimento das crianças com triagem positiva



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE AÇÕES E PESQUISA EM APOIO DIAGNÓSTICO - NUPAD



<b>1ª consulta - Hospital das Clínicas - UFMG</b>		Data: ___/___/___	Idade: ___
Nome: _____			
Data de nascimento: ___/___/___ Reg. HC: _____ Cód. Nupad: _____			
Naturalidade: _____ - _____			
Filiação: Mãe _____ Pai: _____			
Endereço: Rua/Av.: _____ Nº: _____ Complemento: _____			
Bairro: _____ Cidade: _____ - _____			
Telefone(s): (____) _____ CEP: _____			
Pré-natal	Mãe: G ___ P ___ A ___ Idade: _____ anos Consangüinidade? _____		
	Uso de medicamentos? _____		
	Intercorrências? _____		
	Tipo de parto: <input type="checkbox"/> vaginal <input type="checkbox"/> cesáreo APGAR: 1': _____ 5': _____		
	Idade gestacional: _____ Peso: _____ Comp: _____		
Classificação: _____ Intercorrências perinatais? _____			
Histórico familiar	Mãe: Est.: _____ cm (Menarca: _____ anos); Pai: Est.: _____ cm		
	Irmãos: Nº: _____ Algum afetado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
	Observações: _____		
Triagem neonatal	1ª Amostra: Data: ___/___/___ (_____ dias de vida)		
	17-OH-Progesterona: _____ nmol/l (_____ ng/dl)		
	2ª Amostra: Data: ___/___/___ (_____ dias de vida)		
	17-OH-Progesterona: _____ nmol/l (_____ ng/dl)		
	Outra alteração? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____		
Pesquisa de mutação? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim			
Qual (is)? _____			
Anamnese	_____		
	_____		
	_____		

___/___/___	Cariótipo: _____	Valores de referência:	Laboratório:	
___/___/___	Na <sup>+</sup> : _____ mEq/l; K <sup>+</sup> : _____ mEq/l	( )	HC	H. Pardini
___/___/___	17-OH-Progesterona: _____ ng/dl	( )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Exames	Androstenediona: _____ ng/ml	( )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Confirmatórios	Testosterona: _____ ng/ml	( )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
___/___/___	AP Renina: _____ ng/ml/h	( )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
___/___/___	Outro: _____	( )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Idade óssea	Data: ___/___/___ (Idade cron.: )			
US pélvico	_____ _____ _____			
Exame físico	Peso: _____ g (DP: _____) SC: _____ m <sup>2</sup> PC: _____ cm Comprimento: _____ cm (DP: _____); PA: _____ x _____ mmHg Sinais de virilização? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quais? _____ Observações: _____ _____ _____			
Hipóteses diagnósticas	_____ _____ _____			
Conduta	_____ _____			
Retorno	Data: ___/___/___	Próximos exames: ___/___/___		
Exames solicitados	<input type="checkbox"/> 17-OH-Progesterona	<input type="checkbox"/> AP Renina		
	<input type="checkbox"/> Androstenediona	<input type="checkbox"/> Íons		
	<input type="checkbox"/> Testosterona	<input type="checkbox"/> Idade óssea		
	<input type="checkbox"/> Cariótipo	<input type="checkbox"/> US Pélvico		
Observações	_____ _____ _____			
Médico	[Assinatura e Nome do Médico]			





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE AÇÕES E PESQUISA EM APOIO DIAGNÓSTICO - NUPAD



AMBULATÓRIO DE TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA CONGÊNITA DAS SUPRA-RENAIS	
<b>Acompanhamento Clínico</b> - Hospital das Clínicas - UFMG Data: ___/___/___ Folha nº: ___ Nome: _____ Reg. HC: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Cód. Nupad: _____	
HMA	_____ _____ _____ _____ _____ _____
Tratamento	Acetato de hidrocortisona (mg): ___ + ___ + ___ ( ___ mg/m <sup>2</sup> /dia) Fludrocortisona: _____ mg/dia Prednisona (mg): ___ + ___ + ___ Uso regular? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Outros medicamentos: _____
Exames Laboratoriais	Na <sup>+</sup> : ___ mEq/l; K <sup>+</sup> : ___ mEq/l      Valores de Laboratório: 17-OH-Progesterona: _____ ng/dl      referência: HC    H. Pardini Androstenediona: _____ ng/ml      (_____) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Testosterona: _____ ng/dl      (_____) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> AP Renina: _____ ng/ml/h      (_____) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Outros: _____
Idade óssea	Data: ___/___/___ (Idade cron.: _____)
Exame físico	Peso: _____ g (DP: _____) SC: _____ m <sup>2</sup> Com./estatura: _____ cm (DP: _____) VC: _____ cm/ano PA: _____ x _____ mmHg IMC: _____ kg/m <sup>2</sup> (P: _____) _____ _____

Setor de Controle do Tratamento do Nupad / FM / UFMG  
 Fone: (31) 3244-6400 / (31) 3244-6413 - Fax: (31) 3244-6403 / (31) 3244-6451  
 E-mail: controle@medicina.ufmg.br - Site: www.nupad.medicina.ufmg.br

Estágio puberal	G/M	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
	P	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
	A	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3		
	Vol. testicular: E: _____ ml; D: _____ ml Comprimento do fálus: _____ cm					
	Sinais de Virilização? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quais? _____					
	Observações: _____					
Hipóteses Diagnósticas	_____ _____ _____					
Conduta	_____ _____ _____					
Retorno	Data: _____ / _____ / _____					
Exames solicitados	<input type="checkbox"/> 17-OH-Progesterona				<input type="checkbox"/> AP Renina	
	<input type="checkbox"/> Androstenediona				<input type="checkbox"/> Íons	
	<input type="checkbox"/> Testosterona				<input type="checkbox"/> Idade óssea	
	Outros: _____					
Observações	_____ _____					
Médico	_____					

**Apêndice B - Análise molecular do gene CYP21A2 de 51 crianças falso-positivas acompanhadas no PETN-MG**

CÓDIGO	17-OHP papel-filtro (nmol/L)		CONCLUSÃO
	1ª amostra	2ª amostra	
ALH2409	192.16		Não Detectável
ALN977	92.6	106.47	Q318X/?
BAB31814	104.31	114.57	Não Detectável
BHF19580	177.9		Não Detectável
BHF19583	121.94	126.78	Não Detectável
BHF19608	226.87		V281L/?
BHF19630	190.66		Não Detectável
BHF19662	162.66		V281L/?
BOB4168	184.36		Não Detectável
BTX1728	248.36	143.63	Não Detectável
BYD7464	175.18		Não Detectável
BYD7469	232.47		Não Detectável
CAM4699	115.28	182.08	Não Detectável
CCM484	119.54	94	V281L/?
CDI667	122.79	91.69	Não Detectável
CGO6829	93.5	114.23	Não Detectável
CKI208	216.19		Q318X/?
CKJ/303	96.98	112.29	Não Detectável
COP518	130.47	148.32	Não Detectável
COT82610	110	222.45	Não Detectável
CSC206	130.19	113.66	Q318X/?
DSJ519	100.85	165.72	Não Detectável
DSJ530	121.97	87.57	Não Detectável
IBA26777	87.92	90.3	Não Detectável
IPR1339	177.56		Não Detectável
IPR1348	190.73		V281L/?
ITA23209	179.91		Não Detectável
ITC5906	105.93	113.71	Não Detectável
ITJ17933	84.55	96.26	V281L/?
JAZ102	88.52	94.04	Não Detectável
JFD158	250		V281L/?
LAV15881	102.13	138.79	Não Detectável
LAV15940	98.75	117	V281L/?
LAV5922	210.6		Q318X/?
MAN9163	250		I172N/?
MIB676	163.15		Não Detectável
MOD864	99.59	111.73	Não Detectável
MOR1335	229.79		Não Detectável
NAV2178	217.7		Q318X/?
NHB48	114.95	250	Não Detectável
PGU856	196.72		Não Detectável
PMA27755	184.54		Não Detectável
PON12315	250		Q318X/?
PRT31393	138.79	160.11	Não Detectável

SFF84	192.67		I2 splice/?
SL643	142.26	102.71	Não Detectável
SLG46	250	110	Não Detectável
SLR1928	83.22	153.82	Não Detectável
UBS130	171.89		V281L/?
UBY3237	101,66	105.81	Não Detectável
VER870	80.65	91.37	Q318X/?


## **Anexo A - Critérios publicados pela OMS para inclusão de uma doença na triagem neonatal**

### **Figura 1 - Critérios para que uma doença seja candidata a ser incluída na triagem neonatal**

- 1) A doença deve ser relativamente prevalente e grave
- 2) Os sintomas devem ser conhecidos e inaparentes no período neonatal
- 3) Fácil de ser diagnosticada
- 4) Permitir a realização de um teste viável e com alta sensibilidade e especificidade
- 5) O método diagnóstico deve estar disponível para acompanhamento e tratamento das crianças afetadas
- 6) Ter um programa logístico para acompanhamento dos casos até diagnóstico final
- 7) Ser um programa economicamente viável
- 8) Ter estabelecido um programa de acompanhamento clínico com disponibilização dos quesitos mínimos necessários ao sucesso do tratamento

Fonte Manual de normas técnicas e rotinas operacionais para programa nacional de triagem neonatal (2004).

**Anexo B - Parecer ético do COEP – UFMG**

	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b> <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------


**Parecer nº. ETIC 392/07**

**Interessado(a): Profa. Ivani Novato Silva**  
**Departamento de Pediatria**  
**Faculdade de Medicina/UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de agosto de 2007, o projeto de pesquisa intitulado "**Implantação de Programa de Triagem Neonatal para Hiperplasia Congênita da Supra-Renal no Sistema Público de Saúde**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

**Anexo C - Parecer ético da Prefeitura de Belo Horizonte****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE  
BELO HORIZONTE (CEP-SMSA/PBH)**

**Avaliação de projeto de pesquisa – Protocolo 083/2007**

**Projeto:** “Implantação do Programa de triagem neonatal para hiperplasia congênita da supra-renal no Sistema Público de Saúde”

**Pesquisadora:** Ivani Nonato Silva

**Exposição de motivos**


A hiperplasia congênita da supra-renal (HAC) é uma doença genética com manifestação clínica desde o nascimento. A incidência mundial estimada é de 1:15.000 nascidos vivos, com variações populacionais. Causa hiperandrogenismo, desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia nos primeiros 30 dias podendo levar ao óbito se não diagnosticada e tratada.

**Parecer:**

O projeto acima referido cumpriu os requisitos da resolução 196/96 da CONEP, tendo sido aprovado na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final desde, se em prazo inferior a um ano.

Celste de Souza Rodrigues - BM: 37316-1  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - SMSA/BH

  
Celeste de Souza Rodrigues  
Coordenadora do CEP-SMSA/PBH




FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

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

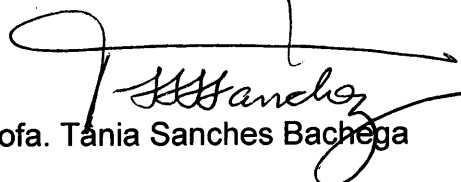


**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelas Professoras Doutoras Ivani Novato Silva, Vera Maria Alves Dias e Tânia Sanches Bachega, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DO PROGRAMA-PILOTO DE TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS**, apresentada pela mestranda **ISABELA LEITE PEZZUTI**, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 17 de dezembro de 2010.

  
Prof. Ivani Novato Silva  
Orientadora

  
Prof. Vera Maria Alves Dias

  
Prof. Tânia Sanches Bachega





FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **ISABELA LEITE PEZZUTIN**º de registro .2009667128. Às quatorze horas, do dia **dezessete de dezembro de dois mil e dez**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"AVALIAÇÃO DO PROGRAMA-PILOTO DE TRIAGEM NEONATAL PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS"**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ivani Novato Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Ivani Novato Silva/Orientadora

Instituição: UFMG

Indicação: Aprovada

Profa. Vera Maria Alves Dias

Instituição: UFMG

Indicação: aprovada

Profa. Tânia Sanches Bachega

Instituição: USP

Indicação: aprovada

Pelas indicações a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 17 de dezembro de 2010.

Profa. Ivani Novato Silva/Orientadora

Profa. Vera Maria Alves Dias

Profa. Tânia Sanches Bachega

Profa. Ana Cristina Simões e Silva/Coordenadora

Profa. Ana Cristina Simões e Silva  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente  
Faculdade de Medicina/UFMG

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

CONFERE COMO ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação

ck