



Jornal de Pediatria

ISSN: 0021-7557

ISSN: 1678-4782

Sociedade Brasileira de Pediatria

Witchel, Selma Feldman
Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia:
beyond 17-hydroxyprogesterone concentrations#, ##
Jornal de Pediatria, vol. 95, no. 3, 2019, May-June, pp. 257-259
Sociedade Brasileira de Pediatria

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jped.2018.06.003>

Available in: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=399760245001>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's webpage in redalyc.org

UNEM
redalyc.org

Scientific Information System Redalyc
Network of Scientific Journals from Latin America and the Caribbean, Spain and
Portugal

Project academic non-profit, developed under the open access initiative



EDITORIAL

Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: beyond 17-hydroxyprogesterone concentrations☆☆☆



Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita: além das concentrações de 17-Hidroxiprogesterona

Selma Feldman Witchel 

University of Pittsburgh, Children's Hospital of Pittsburgh of University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), Pediatrics, Pittsburgh, Estados Unidos

As hiperplasias adrenais congênitas (HACs) abrangem um grupo de distúrbios autossômicos recessivos devido a defeitos na esteroidogênese adrenal. O mais comum é a deficiência de 21-hidroxilase devido a mutações no gene 21-hidroxilase (*CYP21A2*). O espectro clínico varia de insuficiência adrenal com risco de vida a sintomas mínimos que dependem das mutações específicas do gene *CYP21A2*.¹ O fenótipo clínico geralmente reflete a atividade funcional da mutação mais suave. A prevalência das formas clássicas, perdedora de sal e virilização simples, difere entre as populações, varia de aproximadamente 1 em 6.000 na Índia a 1 em 19.000 no Japão.² A prevalência de HACs não clássicas ou leves é alta e foi relatada em 1 em 2000 entre brancos nos Estados Unidos.³

O objetivo da pediatria é a prevenção da doença, com o desenvolvimento de vacinas. Outra área de prevenção é o desenvolvimento de programas para triagem e detecção de neonatos para os quais uma intervenção precoce seria benéfica. Na endocrinologia pediátrica, os programas de triagem neonatal (NBS) para detecção de hipotireoidismo congênito fornecem um modelo no qual a intervenção precoce pre-

vine resultados precários. Para as HACs, o risco elevado de morbidez e mortalidade nas formas clássicas levou ao desenvolvimento de um ensaio em papel de microfiltro para 17-OHP em 1977.⁴ Posteriormente, os protocolos para HAC dos NBS com base nos ensaios para 17-OHP foram estabelecidos em mais de 40 países.

As considerações antes de estabelecer um programa de triagem incluem a carga da doença, conhecer a prevalência da doença, a sensibilidade e a especificidade do teste de triagem e as considerações éticas com relação à privacidade e ao consentimento informado.⁵ Os programas de NBS são obrigados a desenvolver métodos confiáveis para coletar os espécimes de mancha de sangue em papel-filtro de todos os recém-nascidos.⁶ Os espécimes precisam ser coletados e processados em um escopo temporal específico. Os coeficientes de variação intraensaio e interensaio para o teste de laboratório precisam ser baixos. E, por fim, um sistema para localizar e informar os pais e médico(s) adequado(s) é essencial para um programa de NBS válido.

Para HACs, o objetivo tem sido identificar os neonatos com as formas perdedora de sal e virilização simples para prevenir morbidez e mortalidade devido à insuficiência adrenal aguda e reconhecer as mulheres afetadas.⁷ O NBS para HACs também pode identificar indivíduos com HACs não clássicas. Esses indivíduos podem apresentar sintomas mínimos e nunca precisar de terapia de reposição hormonal. Para essas famílias, ter conhecimento do diagnóstico genético pode gerar anos de ansiedade devido à incerteza com relação ao desenvolvimento dos sintomas.

DOI se refere ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2018.06.003>

☆ Como citar este artigo: Witchel SF. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: beyond 17-hydroxyprogesterone concentrations. J Pediatr (Rio J). 2019;95:257–9.

☆☆ Ver artigo de Kopacek et al. nas páginas 282–90.

E-mail: witchelsf@upmc.edu

Assim, um desafio da triagem das HACs é garantir sensibilidade máxima (proporção de testes positivos entre todos os indivíduos com a doença), valor preditivo positivo máximo (proporção dos testes positivos verdadeiros entre todos os testes) e especificidade máxima (proporção de testes negativos entre todos os indivíduos não afetados). Por que isso é um obstáculo para o NBS para HACs? Para atingir quase 100% de sensibilidade, o ponto de corte para a 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) é estabelecido de forma que aproximadamente 1% de todos os testes seja relatado como positivo.⁸ No nascimento, as concentrações de 17-OHP são altas e apresentam queda nas primeiras 48-72 horas de vida. A coleta precoce do espécime pode, assim, levar a um resultado falso positivo. Os resultados falso positivos (valores elevados de 17-OHP) podem ocorrer em neonatos prematuros e heterozigotos e estressados.⁹ Alguns imunoenaios de 17-OHP reagem de forma cruzada com outros esteroides, como sulfato de 17-hidroxipregnenolona e compostos 15 β -hidroxilados, que levam a resultados falso positivos.⁸ A maior parte dos ensaios de 17-OHP é feita com kits comerciais que podem variar devido a diferenças de temperatura sazonais e variações não previstas do kit do fabricante.¹⁰ Os resultados falso positivos geram ansiedade e custos inerentes na avaliação de acompanhamento para excluir o diagnóstico de HACs.¹¹ Podem ocorrer resultados falso negativos, em geral mais comuns em meninas do que em meninos.¹² O tratamento materno com glicocorticoides também pode levar a resultados falso negativos.

Esses desafios levaram ao desenvolvimento de estratégias destinadas a melhorar o valor preditivo positivo. No estudo transversal de Kopacek et al., seus objetivos foram descrever os resultados de uma triagem de neonatos com HACs incluídos em um programa de saúde pública no Sul do Brasil, para avaliar as características clínicas de neonatos identificados por meio desse programa, e avaliar a utilidade do teste de genética *CYP21A2* no protocolo de NBS.¹³ Durante os dois anos desse estudo, 217.965 amostras foram obtidas do 3º ao 40º dia pós-parto. Um ensaio de imunofluorescência de tempo resolvido foi usado para medir as concentrações de 17-OHP em manchas de sangue secas. Para minimizar os resultados falso positivos, Kopacek et al. optaram por usar pontos de corte para quatro pesos ao nascer estratificados por experiência brasileira e internacional.^{14,15} Amostras repetidas foram obtidas geralmente na 3ª semana de idade para neonatos com valores elevados de 17-OHP ou quando as mães haviam usado corticosteroide na gravidez.

Para avaliar o valor de um segundo teste molecular, os autores determinaram o 17-OHP e o teste genético de *CYP21A2* na segunda amostra. Eles usaram um ensaio SNaPshot para detectar 12 mutações comuns de *CYP21A2* e um ensaio de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) para detectar recombinações.¹⁶ Os valores elevados de 17-OHP para os pontos de corte de peso ao nascer foram detectados em 147 neonatos. Desses 147 neonatos, 15 casos foram confirmados como HAC clássica. Como seria previsto, os neonatos com HAC clássica apresentaram as concentrações mais elevadas de 17-OHP em ambos os pontos de tempo. Dos 15 pacientes com HAC clássica, todos foram identificados por NBS antes de o diagnóstico clínico confirmar os benefícios do programa de NBS. Dos 132 resultados positivos restantes da triagem de

17-OHP, o segundo teste genético revelou que sete neonatos apresentaram HAC não clássica, 14 eram portadores heterozigotos e 96 apresentaram resultados falso positivos. Nessa situação, conhecer o diagnóstico específico pôde direcionar um manejo adequado.

Kösel et al. também testaram uma segunda abordagem com o uso do teste molecular de *CYP21A2* para amostras com valores elevados de 17-OHP e concluíram que, apesar do custo ligeiramente mais elevado, esse paradigma de teste pode diminuir a necessidade de segundas amostras e prevenir a ansiedade dos pais.¹⁷ Contudo, a análise genética molecular pode ser complicada, pois o *CYP21A2* está localizado em um *locus* genético complexo fisicamente próximo a um pseudogene não funcional altamente homólogo (*CYP21A1P*). A maior parte das mutações do *CYP21A2* associadas às HACs abrange a sequência do *CYP21A1P* e representa eventos de recombinação (conversão do gene) entre *CYP21A2* e *CYP21A1P*. Três genes vizinhos, serina/treonina-quinase (RP), complemento C4 e tenascina (TNX), mapeiam esse *locus*. Esses quatro genes formam uma unidade chamada módulo RCCX, que pode ser excluída ou duplicada. Além dessa variação de número de cópias, a homologia de alta sequência entre o gene funcional *CYP21A2* e seu pseudogene não funcional *CYP21A1P* complica o teste genético.¹⁸ Discriminar mutações deletérias de variantes de significado desconhecido (VSD) descobertas pelo sequenciamento completo do genoma e exoma pode ser problemático.¹⁹ Em alguns casos, vários métodos laboratoriais e genotipagem dos pais são necessários para determinar de forma precisa o genótipo de uma criança.²⁰

A coleta de uma segunda amostra de sangue tem sido usada para melhorar os parâmetros de desempenho de NBS. Atualmente, aproximadamente 22% dos neonatos americanos são rotineiramente examinados uma segunda vez; isso melhorou a detecção de neonatos com virilização simples e NCAH.²¹ Outros paradigmas envolvem o uso de pontos de corte com base na idade gestacional, coleta de uma segunda amostra para o imunoensaio de 17-OHP, cromatografia líquida seguida de espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), determinação das concentrações de 21-desoxicortisol ou proporções hormonais, como a proporção de 17-OHP/11-desoxicortisol.^{8,22,23}

A reflexão sobre os detalhes deste estudo podem fornecer conhecimento e perspectivas adicionais. Dois aspectos deste estudo merecem comentários adicionais: 1) Uso materno de glicocorticóides e 2) Caracterização da variante IVS2-13A/C>T. Algumas mães tomavam glicocorticóides (GC) antes do parto. As indicações de uso do GC e o tipo de GC não foram descritos. As mães tomam GC para tratamento pré-natal para prevenir a virilização genital para neonatos supostamente afetados, para trabalho de parto prematuro iminente ou por outro motivo?

Os autores relataram uma nova variante, IVS2-13A/C>T em dois indivíduos. Esses pacientes foram chamados como portadores heterozigotos. Essa mutação *CYP21A2*, IVS2-13A/C>G, envolve o mesmo nucleotídeo e foi a mutação mais comumente identificada nesta coorte. A mutação A/C>G cria um novo local aceitador de *splicing* a montante e resulta em *splicing* aberrante do intron 2, retenção de 19 nucleotídeos intrônicos e um codão de parada prematuro a jusante.²⁴ Contudo, a possibilidade de a variante A/C>T

representar uma variante benigna ou VUS não foi abordada. A caracterização funcional com o uso de estudos com expressão *in vitro* ou análise *in silico* com o uso de software de previsão de bioinformática pode ser usada para caracterizar a relevância funcional dessa variante intrônica.

A detecção precoce, a conformação do diagnóstico e o tratamento são benéficos para os indivíduos com as formas perdedora de sal e virilização simples das HACs. Os pediatras, médicos da família, endocrinologistas pediátricos, obstetras e neonatologistas precisam ter conhecimento dos programas locais de NBS e entender as limitações atuais dos exames das HACs. O futuro é promissor, pois há a evolução da metodologia para atingir melhores valores preditivos positivos para NBS das HACs.

Conflitos de interesse

O autor declara não haver conflitos de interesse.

Referências

- Witchel SF. Congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2017;30:520–34.
- Kishore Kumar R, Das H, Kini P. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in India: what do we need to watch out for? *J Obstet Gynaecol India.* 2016;66:415–9.
- Hannah-Shmouni F, Morissette R, Sinaii N, Elman M, Prezant TR, Chen W, et al. Revisiting the prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia in US Ashkenazi Jews and Caucasians. *Genet Med.* 2017;19:1276–9.
- 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.
- Grosse SD, Rogowski WH, Ross LF, Cornel MC, Dondorp WJ, Khoury MJ. Population screening for genetic disorders in the 21st century: evidence, economics, and ethics. *Public Health Genomics.* 2010;13:106–15.
- McCabe ER. Newborn screening: a complex system that requires a culture of safety. *Mol Genet Metab.* 2014;113:6–7.
- Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordensström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr.* 2014;168:567–74.
- White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5:490–8.
- 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.
- Pearce M, Dauerer E, DiRienzo AG, Caggana M, Tavakoli NP. The influence of seasonality and manufacturer kit lot changes on 17 α -hydroxyprogesterone measurements and referral rates of congenital adrenal hyperplasia in newborns. *Eur J Pediatr.* 2017;176:121–9.
- Schmidt JL, Castellanos-Brown K, Childress S, Bonhomme N, Oktay JS, Terry SF, et al. The impact of false-positive newborn screening results on families: a qualitative study. *Genet Med.* 2012;14:76–80.
- Pearce M, DeMartino L, McMahon R, Hamel R, Maloney B, Stansfield DM, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. *Mol Genet Metab Rep.* 2016;7:1–7.
- Kopacek C, Prado MJ, da Silva CM, de Castro SM, Beltrão LA, Vargas PR, et al. Clinical and molecular profile of newborns with confirmed or suspicious congenital adrenal hyperplasia detected after a public screening program implementation. *J Pediatr (Rio J).* 2019;95:282–90.
- Hayashi GY, Carvalho DF, de Miranda MC, Faure C, Vallejos C, Brito VN, et al. Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted according to age at sample collection and birthweight improve the efficacy of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;86:480–7.
- 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.
- Prado MJ, de Castro SM, Kopacek C, de Mello MP, Rispoli T, Grandi T, et al. Development of CYP21A2 genotyping assay for the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Mol Diagn Ther.* 2017;21:663–75.
- 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.
- Xu Z, Chen W, Merke DP, McDonnell NB. Comprehensive mutation analysis of the CYP21A2 gene: an efficient multistep approach to the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Diagn.* 2013;15:745–53.
- Simonetti L, Bruque CD, Fernández CS, Benavides-Mori B, Delea M, Kolomonski JE, et al. CYP21A2 mutation update: comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Hum Mutat.* 2018;39:5–22.
- Concolino P, Mello E, Minucci A, Giardina B, Capoluongo E. Genes, pseudogenes and like genes: the case of 21-hydroxylase in Italian population. *Clin Chim Acta.* 2013;424:85–9.
- Held PK, Shapira SK, Hinton CF, Jones E, Hannon WH, Ojodu J. Congenital adrenal hyperplasia cases identified by newborn screening in one- and two-screen states. *Mol Genet Metab.* 2015;116:133–8.
- Tajima T, Fukushi M. Neonatal mass screening for 21-hydroxylase deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2016;25:1–8.
- Tieh PY, Yee JK, Hicks RA, Mao CS, Lee WN. Utility of a precursor-to-product ratio in the evaluation of presumptive positives in newborn screening of congenital adrenal hyperplasia. *J Perinatol.* 2017;37:283–7.
- Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, Cohen JB. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:4081–8.