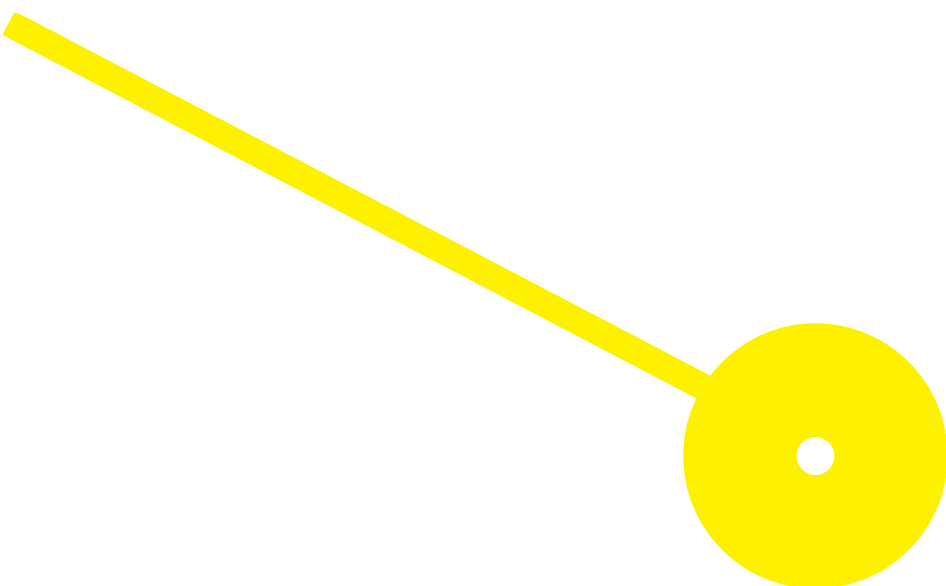




Otimização do rastreio neonatal da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais mediante a utilização de provas de segundo nível

Ana Catarina da Silva Leal

09/2023





Otimização do rastreio neonatal da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais mediante a utilização de provas de segundo nível

Autor

Ana Catarina da Silva Leal

Orientadores

Prof. Doutor Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha/Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge (INSA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Prof. Doutora Sandra Marlene da Silva Mota/Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste projeto foi pautada por algumas conquistas e muitos desafios que, tantas vezes, me fizeram sair da minha zona de conforto e por consequência me trouxeram crescimento e aprendizagens profissionais e pessoais. No entanto, este caminho seria mais tumultuoso e menos proveitoso, sem a ajuda e generosidade de algumas pessoas que não quero deixar passar a oportunidade de prestar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Hugo Rocha, pela disponibilidade, transmissão de conhecimento, dedicação, espírito crítico e resiliência na procura de soluções dos desafios que foram surgindo ao longo de todo este caminho. Sem a sua ajuda, nada disto seria possível.

À minha coorientadora, Professora Doutora Marlene Mota, agradeço todo o apoio prestado na elaboração e aperfeiçoamento deste projeto.

À Professora Doutora Laura Vilarinho, gostaria de agradecer a oportunidade de executar este estudo e por toda a atenção e carinho que demonstrou ao longo do processo.

À Professora Doutora Maria Sousa, coordenadora do Mestrado, agradeço toda a disponibilidade e prontidão com que acolheu os meus pedidos de ajuda.

Aos meus colegas Jorge e Mónica, agradeço o carinho, os conselhos, ajuda e compreensão.

Aos restantes colegas da Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do INSA, agradeço todo o apoio e sugestões dadas ao longo deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de Mestrado, especialmente, à Catarina, Cristiana, Vanessa, Margarida, Manuela, Diana e Maria, pela amizade, paciência e momentos de lazer que me proporcionaram ao longo deste tempo e que tantas vezes, me ajudaram a seguir em frente com mais força.

E por fim, mas com certeza, a peça basilar de todo este processo, à minha família. Aos meus pais e avó por serem sempre porto de abrigo e exemplos de amor, trabalho e luta que me inspiram todos os dias, a tentar ser melhor. À minha irmã Joana, pelo companheirismo, cuidado, amparo nos momentos mais difíceis e auxílio até nas tarefas mais simples do quotidiano, que no fim de contas, facilitam muito o caminho.

Resumo

O rastreio neonatal pode ter um papel essencial na deteção precoce da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais, numa fase pré sintomática, permitindo uma institucionalização precoce de tratamento com melhoras no curso clínico do recém-nascido.

O marcador utilizado para efeitos de rastreio neonatal, é a 17- α -hidroxiprogesterona (17-OHP), quantificada em cartão de Guthrie por fluoroimunoensaio. No entanto, este marcador origina classicamente um elevado número de falsos positivos, sobretudo em recém-nascidos de baixo peso e/ou prematuros. Para colmatar esta limitação, os vários programas de rastreio recorrem ao ajuste dos valores de referência da 17-OHP, em função do peso e/ou idade gestacional e à utilização de provas de segundo nível, através da análise de perfis de esteroides, em sangue em papel. Neste trabalho foi levada a cabo a definição de valores de referência para a 17-OHP (estratificados por peso e idade gestacional) adaptados à população portuguesa de recém-nascidos e foram implementadas as provas de segundo nível. Da conjugação dos valores de referência estratificados e da utilização destas provas de segundo nível, resulta uma abordagem que se traduzirá numa considerável melhoria de sensibilidade e especificidade, caso se considere no futuro a introdução do rastreio desta patologia no Programa Nacional de Rastreio Neonatal.

Palavras-chave: Rastreio Neonatal; Hiperplasia Congénita das Suprarrenais; Deficiência em 21-hidroxilase; 17- α -Hidroxiprogesterona; Provas de segundo nível;

Abstract

Neonatal screening may play an essential role in the early detection of Congenital Adrenal Hyperplasia in a pre-symptomatic phase, allowing an early institutionalization of treatment with improvements in the clinical course of the newborn.

The marker used for neonatal screening purposes is 17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP), quantified in Guthrie card by fluoroimmunoassay. However, this marker classically leads to a high number of false positives, especially in low birth weight and/or premature newborns. To overcome this limitation, the various screening programs resort to the adjustment of the reference values of 17-OHP, according to weight and/or gestational age and the use of second-level tests, through the analysis of steroid profiles, in paper blood. In this work, the definition of reference values for 17-OHP (stratified by weight and gestational age) adapted to the Portuguese population of newborns was carried out and the second-tier tests were implemented. The combination of stratified reference values and the use of these second-tier tests results in an approach that will translate into a considerable improvement in sensitivity and specificity, if the introduction of screening for this pathology in the National Neonatal Screening Program is considered in the future.

Keywords: Newborn screening; Congenital Adrenal Hyperplasia; 21-hydroxylase deficiency
17- α - Hydroxyprogesterone; Second-tier test;

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Glândulas suprarrenais e produção de hormonas esteroides	1
1.2.	Etapas da Esteroidogénese suprarrenal.....	2
1.2.1.	Transporte do colesterol para a mitocôndria.....	3
1.2.2.	Formação da pregnenolona.....	3
1.2.3.	Progesterona.....	3
1.2.4.	Aldosterona	4
1.2.5.	Cortisol.....	4
1.2.6.	Androgénios suprarrenais.....	4
1.3.	Regulação da secreção hormonal das glândulas suprarrenais.....	6
1.4.	Esteroidogénese no período gestacional.....	6
1.5.	Hiperplasia Congénita das Suprarrenais	7
1.5.1.	Epidemiologia	9
1.5.2.	Défice de 21-Hidroxilase.....	10
1.5.3.	Manifestações clínicas.....	11
1.5.4.	Aspetos genéticos.....	13
1.5.5.	Diagnóstico bioquímico	15
1.5.6.	Diagnóstico precoce.....	16
1.5.7.	Tratamento	21
2.	Objetivos.....	24
3.	Métodos	24
3.1.	Seleção de amostras	24
3.2.	Doseamento da 17- α -OH-progesterona.....	25
3.2.1.	Fluoroimunoensaio de fase sólida de resolução temporal.....	25
3.2.2.	Procedimento Experimental.....	25
3.3.	Otimização das provas de segundo nível.....	26
3.3.1.	Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). 26	
3.3.2.	Procedimento Experimental.....	27

3.4. Tratamento dos dados.....	32
4. Resultados.....	33
4.1. Caracterização da amostra.....	33
4.2. Valores de referência da 17-OH-Progesterona.....	33
4.3. Provas de segundo nível.....	39
4.3.1. Quantificação.....	41
5. Discussão.....	47
6. Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51
Apêndices.....	64

Índice de Figuras

Figura 1. Representação das glândulas suprarrenais.....	1
Figura 2. Representação da esteroidogénese, onde é possível observar défice de mineralocorticóides, glicocorticóides e o excesso de androgénios, presente na HCSR por défice da enzima 21-hidroxilase. ¹⁰	5
Figura 3. Esquematização do sistema renina-angiotensina.....	8
Figura 4. Representação da fisiopatologia da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais por défice de 21-hidroxilase.....	9
Figura 5. Estádios de virilização, no sexo feminino mediante a Escala de Prader ¹⁸	12
Figura 6. Diagnóstico bioquímico da Hiperplasia Congénita das suprarrenais ⁵⁹	16
Figura 7. Perfil de esteroides por LC-MS/MS, num controlo normal (A), num falso-positivo por fluoroimunoensaio (B) e num caso confirmado de HCSR (C) ⁷⁷	20
Figura 8. Microplaca de 96 poços, após adição dos discos de sangue seco em papel, correspondentes aos calibradores, controlos, amostras e soluções recomendadas.....	26
Figura 9. Representação do método espectrometria de massa (LC-MS/MS) ⁸³	27
Figura 10. Estudo indicando o pico com m/z 339, correspondente à d8-17-OHP intacta.....	30
Figura 11. Condições onde não existe fragmentação do d8-17-OHP (339 m/z).....	31

Figura 12. Condições finais com fragmentação do d8 – 17-OHP (ião filho de referência 100,1 m/z).....	31
Figura 13. Variação da concentração de 17-OHP (nmol/L), em função da idade gestacional..	33
Figura 14. Variação da concentração de 17-OHP (nmol/L), em função do peso.....	34
Figura 15. Diagrama de caixa representativo da dispersão dos valores de 17-OHP, nos subgrupos em função da idade gestacional.....	37
Figura 16. Diagrama de caixa representativo da dispersão dos valores de 17-OHP, nos subgrupos em função do peso.....	38
Figura 17. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de uma amostra fornecida pelo controlo de qualidade externo – CDC.....	39
Figura 18. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de um controlo normal.....	40
Figura 19. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de um caso positivo para HCSR.....	40
Figura 20. Perfil cromatográfico de esteroides de um caso falso positivo para HCSR.....	40
Figura 21. Curva de calibração do cortisol, a partir dos calibradores do laboratório parceiro...	41
Figura 22. Curva de calibração do cortisol – CDC ($r^2=0,9993$).....	42
Figura 23. Curva de calibração da 17-OHP – CDC ($r^2=0,9982$).....	42
Figura 24. Curva de calibração da A4 – CDC ($r^2=0,9995$).....	43
Figura 25. Curva de calibração do 21-D – CDC ($r^2=0,9999$).....	43
Figura 26. Curva de calibração do 11-D – CDC ($r^2=0,9987$).....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Funções das hormonas esteroides produzidas nas glândulas suprarrenais ^{1,2,3}	2
Tabela 2. Défices enzimáticos da esteroidogénese mais comuns que originam a hiperplasia congénita das suprarrenais ²³	10
Tabela 3. Esquematização das especificidades das formas Clássica e Não Clássica de HCSR por défice de 21-hidroxilase.....	13
Tabela 4. Média e intervalos de referência das concentrações de esteroides (nmol/L), pelo método LC-MS/MS para casos normais e casos confirmados de HCSR, segundo Hora M ²⁵	21
Tabela 5. Variações do gradiente da bomba de LC, ao longo da corrida.....	28
Tabela 6. Condições de espetrometria de massa.....	29

Tabela 7. Massas correspondentes a cada metabolito em estudo, nos quadrupolos.	29
Tabela 8. Condições de fragmentação utilizadas.....	30
Tabela 9. Subgrupos para os níveis de 17-OHP, em função da idade gestacional e peso, em análise.	35
Tabela 10 . Aplicação do Método de Partição de Lahti, para a divisão dos subgrupos em função da idade gestacional (IG), para os níveis de 17-OHP.	36
Tabela 11. Aplicação do Método de Partição de Lahti, para a divisão dos subgrupos em função do peso, para os níveis de 17-OHP.	36
Tabela 12. Subgrupos definitivos para os níveis de 17-OHP, em função da idade gestacional e peso.....	37
Tabela 13. Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função da idade gestacional.	38
Tabela 14. Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função do peso.	39
Tabela 15. Resultados das provas de segundo nível em casos confirmados de HCSR.....	44
Tabela 16. Resultados das provas de segundo nível em recém-nascidos de termo, em que foram obtidos valores normais de 17-OHP no fluoroimunoensaio.	45
Tabela 17. Resultados das provas de segundo nível em alguns casos, em que se obteve valores mais elevados de 17-OHP, no fluoroimunoensaio, em RN pré-termo.....	46
Tabela 18. Resultados das provas de segundo nível em alguns casos, em que foram obtidos valores normais de 17-OHP no fluoroimunoensaio, em RN pré-termo.....	46

Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
HCSR	Hiperplasia Congénita das Suprarrenais
StAR	Proteína reguladora esteroideogénica aguda
17-OHP	17- α -Hidroxiprogesterona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina
21-OH	21-Hidroxilase
PRA	Aumento da renina plasmática
PNRN	Programa Nacional de Rastreio Neonatal
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem
NCCLS	Comité Nacional de Normas Laboratoriais Clínicas
IG	Idade Gestacional
CE	Energia de Colisão
DP	Potencial de Desintegração
EP	Potencial de Entrada
CxP	Potencial de saída da célula de colisão
m/z	Razão massa/carga
MRM	Monitorização de Reações Múltiplas
A4	Androstenediona
F	Cortisol
21-D	21-desoxicortisol
11-D	11-desoxicortisol
CPS	Contagens por segundo
CDC	Centro para Controlo da Doença e Prevenção
R²	Coeficiente de correlação

1. Introdução

1.1. Glândulas suprarrenais e produção de hormonas esteroides

As glândulas suprarrenais são duas glândulas endócrinas, de pequenas dimensões, localizadas no polo superior de cada rim. Entre as principais funções destas glândulas, é de destacar a produção de hormonas que auxiliam na regulação do organismo, sistema imunitário, pressão arterial e resposta ao stress^{1,2}. Estas, são formadas por uma camada interna denominada medula e uma camada externa designada córtex, que apresentam duas origens embrionárias diferentes que originam tecidos com funções distintas (figura 1).

A medula tem origem embrionária na mesoderme. Nela, são produzidas as catecolaminas, designadamente, a adrenalina e a noradrenalina (tabela 1). Estas hormonas são libertadas, geralmente, em condições de stress^{1,2}.

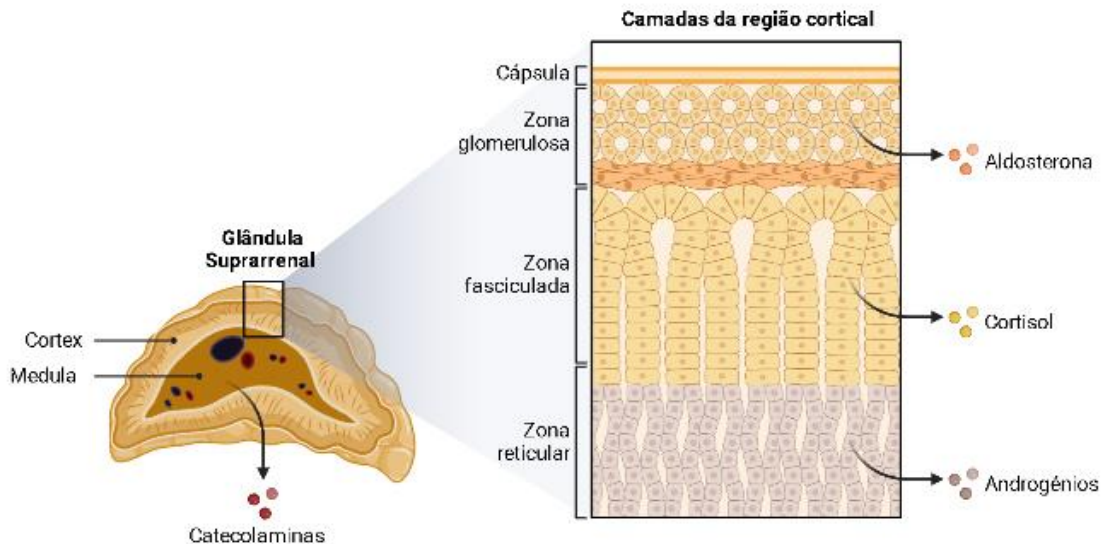


Figura 1. Representação das glândulas suprarrenais.

Por sua vez, o córtex tem origem embrionária numa subpopulação de células da crista neural e é dividido em três zonas: a glomerulosa que é controlada pelo sistema renina angiotensina, a zona fasciculada e a zona reticular, dependente do controlo da hormona adrenocorticotrófica

hipofisária (ACTH). Nele, são produzidas hormonas esteroides, conhecidas no seu conjunto por hormonas corticosteroides, detalhadamente: mineralocorticóides, glicocorticóides e androgénios^{1,2,3}.

As hormonas mineralocorticóides, especialmente a aldosterona, é produzida na zona glomerulosa (tabela1). Já as hormonas glicocorticóides, nomeadamente o cortisol são produzidas na zona fasciculada. Além disso, ainda que em pequena quantidade na zona reticular, são produzidas hormonas sexuais precursoras, designadamente a androstenediona (tabela 1)^{1,2,3}.

Tabela 1. Funções das hormonas esteroides produzidas nas glândulas suprarrenais^{1,2,3}.

	Hormonas	Funções
Medula	Adrenalina	Ação hipertensiva e vasoconstritora da circulação periférica; Regulação da musculatura lisa, com ação análoga à do sistema nervoso simpático;
	Noradrenalina	Função de mediadora química na transmissão nervosa simpática; Manutenção da pressão arterial em condições adversas;
Córtex	Aldosterona	Regulação da pressão arterial; Manutenção do equilíbrio eletrolítico do organismo;
	Cortisol	Estimulação da gliconeogénese; Catabolismo proteico; Manutenção da pressão arterial em resposta a situações de stress; Diurese;
	Androstenediona	Hormona precursora de estrogénios e testosterona, de acordo o sexo;

1.2. Etapas da Esteroidogénese suprarrenal

A síntese de hormonas esteroides glicocorticóides, mineralocorticóides e androgénios, a partir do colesterol é um processo metabólico complexo e que envolve inúmeras enzimas. Assim sendo, a existência de bloqueios enzimáticos nesta via metabólica pode condicionar não só a produção das hormonas como também levar à acumulação de alguns metabolitos. Estas irregularidades levam ao surgimento de várias doenças genéticas, entre elas a Hiperplasia

Congénita das Suprarrenais (HCSR) ^{1,2}. A esteroidogénese suprarrenal encontra-se representada na figura 2.

1.2.1. Transporte do colesterol para a mitocôndria

Na primeira etapa da esteroidogénese, o colesterol é transportado para a membrana interna da mitocôndria. A proteína responsável por este transporte desde a membrana externa mitocondrial para à membrana interna mitocondrial é a proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR), que é imprescindível para o desenvolvimento da esteroidogénese suprarrenal e gonadal. Assim, mutações no gene que codifica esta proteína provocam hiperplasia suprarrenal lipoide ⁴.

Não obstante, é de salientar que a proteína não está expressa em outros tecidos responsáveis pela esteroidogénese, como por exemplo a placenta e sistema nervoso central, sugerindo a existência de outros mecanismos de transporte do colesterol para a mitocôndria, nestes tecidos ^{5,6}.

1.2.2. Formação da pregnenolona

Nesta etapa, a enzima colesterol desmolase, intervém em três reações químicas, nomeadamente, a 20- α -hidroxilação, 22-hidroxilação e por fim corte da cadeia lateral na posição 20-22, que resultam na transformação do colesterol em pregnenolona ⁶.

A ação sucessiva da atividade da 22-desidrogenase e 20,22-desmolase da enzima, resulta no rompimento da cadeia lateral entre os átomos de carbono 20 e 22, produzindo assim a pregnenolona. Por sua vez, a pregnenolona migra da mitocôndria para o retículo endoplasmático, onde acontecem as reações que levam à biossíntese dos restantes corticoides suprarrenais ⁶.

1.2.3. Progesterona

No retículo endoplasmático, dá-se a transformação da pregnenolona em progesterona, por ação do sistema enzimático 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase II, constituindo assim, um ponto de partida de outras enzimas específicas envolvidas na síntese de corticoides, nomeadamente, mineralocorticóides, glicocorticóides, androgénios e estrogénios ⁷.

1.2.4. Aldosterona

Inicialmente, a ação da enzima 21-hidroxilase compreende a transformação da progesterona em 11-deoxicorticosterona⁶.

No interior da mitocôndria, a 11-deoxicorticosterona, por intermédio da ação da 11- β -hidroxilase, é transformada em corticosterona⁶.

Após uma reação catalisada pela 18-hidroxilase, a corticosterona é convertida em 18-hidroxicorticosterona. Por fim, por ação da 18-oxidase, é formada a aldosterona⁶.

1.2.5. Cortisol

Na zona fasciculada das glândulas suprarrenais, ocorre a biossíntese do cortisol, considerada a hormona glicocorticóide mais importante⁸.

Nesta fase, ocorrem 3 hidroxilações sucessivas, catalisadas por diferentes enzimas⁸.

A primeira reação de hidroxilação pode acontecer quer sobre a progesterona, quer sobre a pregnenolona. Nesta, a ação da 17- α -hidroxilase sobre a pregnenolona, leva à formação da 17- α -hidroxipregnenolona, que por sua vez, quando sofre a ação da enzima 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase, transforma-se em 17-hidroxiprogesterona (17-OHP). Já, quando é a progesterona a sofrer a ação da enzima 17- α -hidroxilase, ocorre a formação direta da 17-OHP⁸. Por sua vez, a 17-OHP serve de substrato para a enzima 21-hidroxilase, emergindo na síntese de 11-desoxicortisol, que quando ativado pela enzima 11- β -hidroxilase, transforma-se em cortisol, considerado o composto mais ativo desta via metabólica⁸.

1.2.6. Androgénios suprarrenais

Os androgénios suprarrenais (particularmente a dehidroepiandrosterona (DHEA), a androstenediona e a testosterona), são sintetizados essencialmente na zona reticular do córtex da glândula suprarrenal, embora também possa acontecer na zona fasciculada⁶.

Para a formação de DHEA, uma pequena fração da 17-hidroxipregnenolona serve de substrato à enzima 17- α -hidroxilase, que mediante as suas duas atividades enzimáticas, nomeadamente a 17-hidroxilase e a 17,20-liase, que levam à rutura oxidativa e eliminação da cadeia de átomos

de carbono, mais precisamente ao nível do carbono 17 do anel, originando assim a síntese de DHEA ^{6,9}.

De seguida, através de reações catalisadas pela 3- β -hidroxidesidrogenase, é formada a androstenediona. Esta também se pode formar a partir da 17-OHP, por intermédio da atividade enzimática da 17,20-liase ^{6,9}.

Já a testosterona é formada a partir da redução (átomo de carbono 17) da androstenediona, por ação da enzima 17- β -hidroxiesteróide desidrogenase. Não obstante, a produção e secreção mais preponderante da testosterona acontece fundamentalmente nas gónadas masculinas ^{6,9}. É também de salientar que, o córtex das glândulas suprarrenais tem a capacidade de sintetizar a totalidade das hormonas esteroides, no entanto, em situações normais, não tem a aptidão necessária para suprir as funções endócrinas das gónadas masculinas e femininas ^{6,9}.

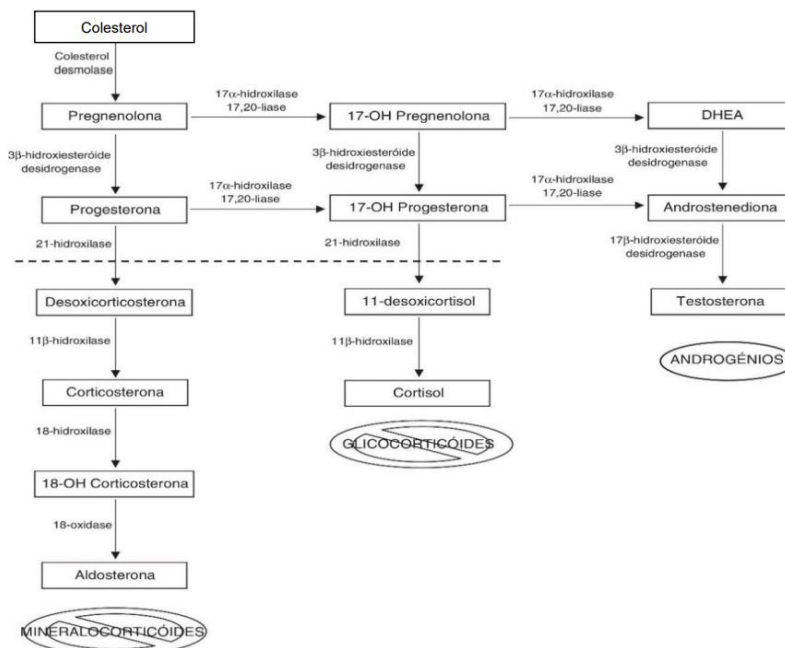


Figura 2. Representação da esteroidogénese, onde é possível observar défice de mineralocorticóides, glicocorticóides e o excesso de androgénios, presente na HCSR por défice da enzima 21-hidroxilase.¹⁰

1.3. Regulação da secreção hormonal das glândulas suprarrenais

As hormonas do córtex suprarrenal são transportadas em combinação com proteínas plasmáticas específicas. A metabolização é efetuada no fígado e a excreção na bÍlis e urina.

No que diz respeito, aos glicocorticóides e androgénios suprarrenais, a regulação é efetuada pela secreção da hormona libertadora da corticotrofina (CRH) e a ACTH, já a síntese de mineralocorticóides também é dependente da secreção de ACTH, não obstante, é regulada principalmente pelo sistema renina-angiotensina (figura 3).^{6,11}

Desta forma, quando há ausência de secreção de ACTH, pela hipófise, a zona fascicular e a zona reticular do córtex suprarrenal, onde são sintetizados o cortisol e os androgénios, sofrem uma atrofia total. Por outro lado, a zona glomerulosa, onde são sintetizados os mineralocorticóides, é praticamente conservada na sua totalidade^{6,11}.

Assim, um aumento da ACTH origina, por consequência um aumento da secreção dos glicocorticóides, mineralocorticóides e androgénios. Caso, este aumento se mantenha, verifica-se uma diminuição da concentração de mineralocorticóides, já que a sua produção é regulada por outros mecanismos^{6,11}.

1.4. Esteroidogénese no período gestacional

A placenta é considerada uma glândula endócrina incompleta, no que concerne à síntese de esteroides. Durante a gravidez, esta é responsável pela produção de quantidades significativas de progesterona, estradiol, estrona e estriol. Estas hormonas assumem um papel importante, quer na manutenção da gravidez e desenvolvimento fetal, quer no parto.¹²

É também de salientar que até à 8ª semana de gestação, são maioritariamente os ovários maternos, os responsáveis pela esteroidogénese, na qual, os estrogénios são formados pela via normal, desde a progesterona e por isso observa-se um aumento da 17-OHP plasmática, com tendência a desaparecer após esse período, quando a placenta se torna a principal responsável pela secreção.¹²

A partir do segundo trimestre de gestação e início do período neonatal, a ACTH é a responsável pelo controlo da regulação da esteroidogénese fetal.¹³

Em recém-nascidos (RN) pré-termo, a capacidade de manter a homeostase pode ser reduzida, já que não há uma correta ativação do eixo hipotálamo-hipófise. Assim, a imaturidade e possíveis patologias associadas, em RN prematuros pode originar uma função adrenal inadequada, estando esta também relacionada com a idade gestacional.¹³

1.5. Hiperplasia Congênita das Suprarrenais

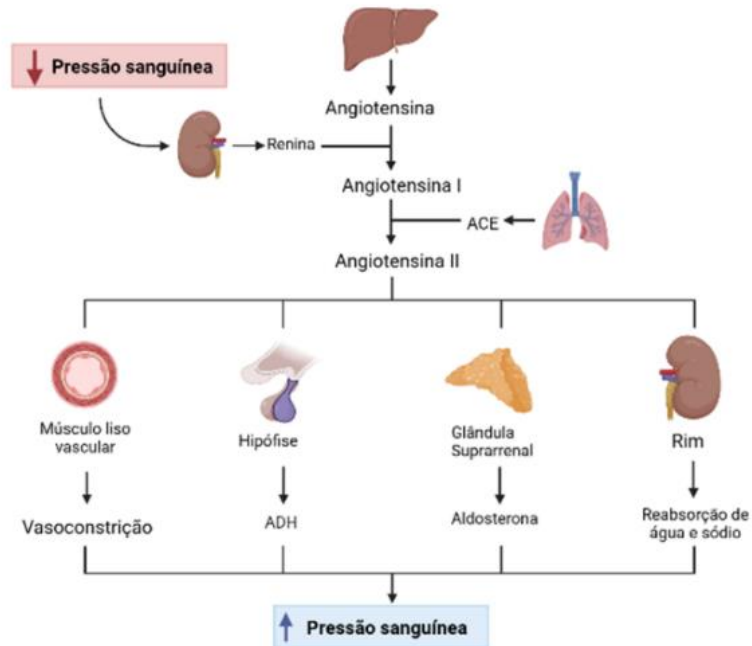
O primeiro relato científico de HCSR, foi efetuado em 1865, por Luigi De Crecchio, através da divulgação, na revista Morgagni, de achados da autópsia de um homem de 44 anos, chamado Giuseppe Marzo, que teria morrido, após uma aparente crise Addisoniana (condição potencialmente fatal, caracterizada por uma progressão rápida de sintomas inespecíficos tais como: fadiga, vômitos, dor abdominal, hipotensão, encefalopatia metabólica, choque, entre outros, resultante da insuficiência aguda de glicocorticoides e mineralocorticóides). Além disso, apresentava órgãos genitais externos masculinos (pênis com cerca de 6 cm, sem testículos) e órgãos reprodutores internos femininos (útero e trompas de Falópio), com um significativo aumento das glândulas adrenais. Mais tarde, descobriu-se que na realidade tratava-se de um indivíduo do sexo feminino com HCSR^{14,15}.

A Hiperplasia Congênita das Suprarrenais compreende um grupo de doenças genéticas com um modo de transmissão autossômica recessiva, que pode ter origem em defeitos em uma de cinco enzimas (21- hidroxilase, 11- β -hidroxilase, 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase, 17- α -hidroxilase e a StAR), envolvidas na biossíntese do cortisol¹⁵.

Quando há uma diminuição dos níveis de cortisol no plasma, o hipotálamo responde aumentando a secreção de hormona libertadora de corticotrofina (CRH) que por sua vez, estimula a hipófise a secretar ACTH que atua sobre o córtex da glândula suprarrenal, originando hiperplasia e aumento da produção de hormonas, incluindo o cortisol (figura 4).

Além disto, em casos de hiperplasia do córtex das glândulas suprarrenais, causada pela elevada produção de ACTH, pode afetar as zonas adjacentes, incluindo a zona glomerulosa, onde a aldosterona é produzida^{15,16}.

Por sua vez, a regulação da aldosterona não é tão dependente do eixo hipotálamo-hipófise quanto o cortisol. Esta é essencialmente regulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (figura 3)^{15,16}.

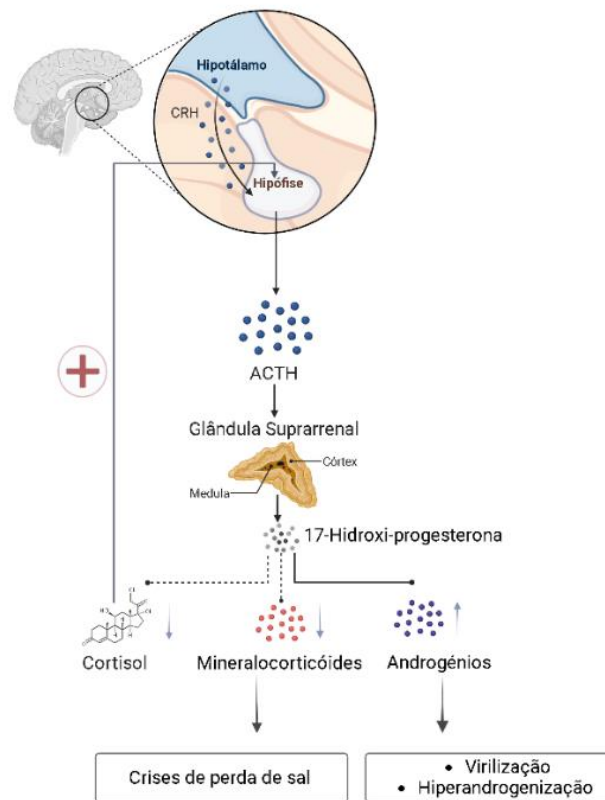


Legenda: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; ACE – enzima conversora da angiotensina; ADH- hormona antidiurética

Figura 3. Esquemática do sistema renina-angiotensina.

Além disso, o aumento da secreção de ACTH, que tem como objetivo a compensação da produção deficitária de cortisol, resulta, paralelamente, na ativação das restantes enzimas funcionais, estimulando a síntese de outras hormonas esteroides que caracterizam alguns dos défices (figura 4)^{17,18}.

As consequências clínicas, manifestadas nos indivíduos afetados, dependem diretamente da posição da via metabólica, onde ocorre o bloqueio enzimático e da sua magnitude. Desta forma, quando o bloqueio enzimático é grave e ocorre nas etapas iniciais da esteroidogénese, pode não existir a produção de nenhuma hormona esteroide, e por isso, tornar-se incompatível com a vida^{17,18}.



Legenda: ↑ - aumento; ↓ - diminuição; +- retroalimentação positiva; CRH- Hormona libertadora da corticotrofina

Figura 4. Representação da fisiopatologia da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais por déficit de 21-hidroxilase.

1.5.1. Epidemiologia

A forma mais comum da HCSR, é causada por mutações no gene *CYP21A2* que codifica a enzima 21-hidroxilase (21-OH), responsável por 90-95% dos casos desta patologia^{10,24}. Os restantes 5% são causados, pelo déficit de outras enzimas como a 11- β -hidroxilase ou da 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase¹⁹.

Devido à variabilidade no que diz respeito ao grau de deficiência enzimática, a HCSR por déficit de 21-hidroxilase, origina duas formas clínicas: a mais severa, designada de forma clássica (que engloba a forma perdedora de sal e a virilizante simples) e a não clássica¹⁹.

A HCSR clássica apresenta uma incidência global de 1 em cada 15 000 nados-vivos, sendo esta semelhante em ambos os sexos. No entanto, esta é particularmente incidente na população de Esquimós Yupic do Alaska (1:280) na ilha francesa de La Réunion (1:2 100), Arábia Saudita (1:5000) e Filipinas (1:7000). Por sua vez, a forma não clássica, apesar de subdiagnosticada, é mais comum, estimando-se que tenha uma incidência de 1 em cada 1 000 nados-vivos, sendo particularmente relevante na população de judeus Ashkenazi da Europa de Leste (1:27) ^{20,21,22}. Além do déficit de 21-OH, outros défices enzimáticos podem ser responsáveis pela HCSR, tal como descritos na tabela 2.

Tabela 2. Défices enzimáticos da esteroidogénese mais comuns que originam a hiperplasia congénita das suprarrenais²³.

Défice enzimático	HCSR (%)	Androgénios	Mineralocorticóides	Glicocorticóides
21-hidroxilase	90-95%	↑	↓	↓
11β-hidroxilase	0,2-8%	↑	↑	↓
17α-hidroxilase	rara	↓	↑	↓
3β-hidroxisteróide desidrogenase	<5%	↓	↓	↓
P450 oxirredutase	rara	Pré-natal ↑ Pós-natal ↓	↔	↓
StAR	rara	↓	↓	↓

Legenda: HCSR – Hiperplasia Congénita das Suprarrenais; StAR – Proteína reguladora esteroidogénica aguda; < - inferior; ↑ – Aumento; ↓ – Diminuição; ↔ – mantém os níveis;

1.5.2. Défice de 21-Hidroxilase

A HCSR por déficit de 21-OH representa cerca de 90 a 95% dos casos desta patologia e por isso é reiteradamente considerado sinónimo de HCSR ^{10,24}.

A enzima 21-OH catalisa a terceira etapa de formação da aldosterona, convertendo a progesterona em desoxicorticosterona e na biossíntese do cortisol é responsável pela conversão da 17-hidroxiprogesterona em 11-desoxicortisol ⁸. A HCSR apresenta uma ampla variabilidade clínica que se traduz num vasto espectro de sintomas, daí a necessidade de

estabelecer uma classificação diferencial, nomeadamente as formas clássicas e as formas não clássicas. Nas formas clássicas, as manifestações clínicas podem surgir já durante o período pré-natal, sendo por norma mais severas. São distinguidas em forma perdedora de sal e a forma virilizante simples. Já, nas formas não clássicas, podem apresentar manifestações clínicas em idade mais tardia, sendo que alguns pacientes podem ser assintomáticos²⁵.

1.5.3. Manifestações clínicas

A forma clássica perdedora de sal é considerada a mais severa e representa cerca de 75% do total de casos da forma clássica. Neste caso, a atividade enzimática é extremamente baixa (<2%), o que origina deficiência na síntese de aldosterona e cortisol. Em consequência do défice em aldosterona, ocorre a perda renal de sódio e níveis de potássio e renina elevados. Em consequência, há uma dificuldade em estabelecer o balanço eletrolítico do organismo, culminando em crises de perda de sal²⁵. Assim, para além dos sinais de virilização no sexo feminino, o hipocortisolismo e a insuficiência de mineralocorticóides, aumenta a predisposição para a crise adrenal, acompanhada de vômitos, desidratação, hipoglicemia, hipotensão, bem como hipercalemia e hiponatremia, logo nos primeiros dias/semanas após o nascimento²⁶⁻²⁹. A crise adrenal, pode ser fatal, caso o tratamento adequado não seja administrado, podendo haver comprometimento do desenvolvimento neurológico, em casos de hipoglicemia acompanhada de hiponatremia²⁶⁻²⁹.

No sexo feminino, o diagnóstico é normalmente precoce, dada a presença de virilização genital, secundária ao excesso de androgénios durante a gravidez. Neste caso, à semelhança da forma virilizante simples, a genitália de recém-nascidos do sexo feminino afetados pode ter aparência variável desde a clitoromegalia até uma apresentação masculina com presença de pénis, uretra e testículos. Todavia, o achado encontrado mais comum inclui clitoromegalia, grandes lábios rugosos e fundidos e um orifício perineal único¹⁵. Nestes casos, dada a semelhança de sintomatologia, deve ser considerado o diagnóstico diferencial como, por exemplo, o Síndrome de Insensibilidade a Androgénios, hiperprolactinemia e tumores das glândulas suprarrenais¹⁸.

Dada a variabilidade observada, relativamente ao grau de virilização, este é classificado tendo em conta a escala de Prader (estadio 1 a 5) (figura 5)¹⁸.

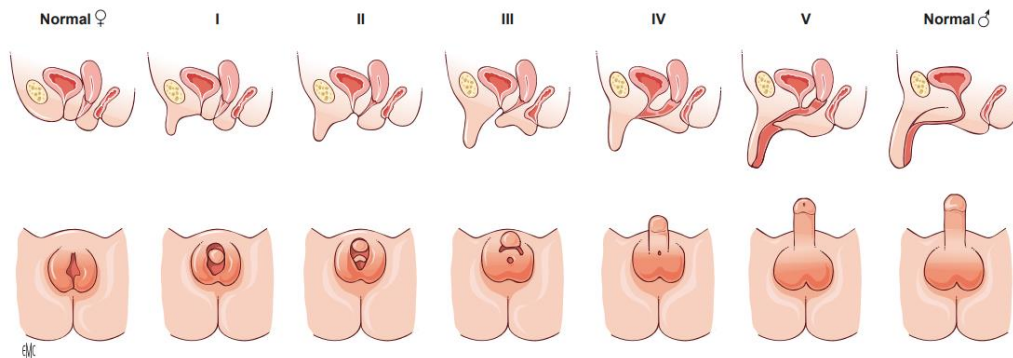


Figura 5. Estádios de virilização, no sexo feminino mediante a Escala de Prader¹⁸.

Por sua vez, os doentes do sexo masculino, não apresentam ambiguidade dos órgãos genitais. Estes, são particularmente propensos à ocorrência de crises adrenais, no período neonatal, logo após alta hospitalar, visto que grande parte da testosterona é produzida nos testículos e não nas glândulas suprarrenais, dificultando o diagnóstico desta patologia. Nestes casos, verifica-se, por vezes, hiperpigmentação genital ou aumento do pénis^{15,25}.

A forma clássica virilizante simples, representa cerca de 25% dos casos correspondentes às formas clássicas. Nesta forma, uma parte da função enzimática é preservada e por isso, a produção de aldosterona é suficiente para manter a homeostase do sódio, exceto em condições extremas. Neste caso, é possível observar sinais de virilização pré-natal dos genitais externos no sexo feminino, hipocortisolismo e puberdade precoce em ambos os sexos. Esta, pode ainda manifestar-se por aceleração do crescimento e da maturação óssea, crescimento anormal do pénis nos rapazes e clitoromegalia nas meninas^{30,31}.

No que diz respeito à forma não clássica da HCSR, é de mencionar que habitualmente tem um início mais tardio, podendo manifestar-se no final da infância, na adolescência ou até mesmo na idade adulta, com o aparecimento de sinais de hiperandrogenismo. A apresentação clínica é muito variável, sendo de destacar a pubarca precoce, hirsutismo, acne, idade óssea avançada, oligomenorreia ou infertilidade. Não obstante, em alguns casos, pode verificar-se ausência de sintomas^{7,23}.

Nas mulheres, durante a adolescência e idade adulta, pode observar-se hirsutismo, oligomenorreia, acne, infertilidade, clitoromegalia, alopecia e amenorreia primária. Além disso, o risco de aborto espontâneo é considerado maior nas mulheres com esta patologia, sendo ainda de referir que 50% das mulheres com HCSR não clássica necessita de efetuar terapêutica glicocorticoide para engravidar^{32,33}. Muitas vezes, é difícil efetuar o diagnóstico diferencial com a Síndrome dos Ovários Poliquísticos, dado que a sintomatologia pode ser muito semelhante^{21,34}. No sexo masculino, pode ocorrer puberdade precoce, acne e baixa estatura, no entanto a maioria dos doentes apresenta uma função testicular e fertilidade normais^{21,34}.

Tabela 3. Esquematização das especificidades das formas Clássica e Não Clássica de HCSR por défice de 21-hidroxilase.

	Forma Clássica				Forma Não clássica	
	Perdedora de sal		Virilizante Simples		M	F
	M	F	M	F		
Idade de apresentação	RN -6 meses	RN -1mês	2 -4 anos	RN-2 anos	Infância a idade adulta	
Virilização	Não	Sim	Não	Sim	Não	
Cortisol	↓		↓		Normal	
Aldosterona	↓		Normal		Normal	
17-OHP	>600 nmol/L		300-600 nmol/L		45-300 nmol/L (após estimulação com ACTH)	
Tratamento	Glicocorticóides e Mineralocorticóides		Glicocorticóides e eventualmente Mineralocorticóides		Glicocorticóides (casos sintomáticos)	

Legenda: M – Sexo masculino; F- sexo feminino; RN – recém-nascido; ACTH- Hormona adrenocorticotrófica; 17-OHP – 17-hidroxiprogesterona

1.5.4. Aspetos genéticos

A Hiperplasia Congénita das Suprarrenais por défice de 21-hidroxilase, deve-se maioritariamente por mutações no gene *CYP21A2*, que codifica esta enzima^{15,35,36}.

O gene *CYP21A2* localiza-se na região do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe III, no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3), próximo do seu pseudogene inativo *CYP21A1P*^{37,38}. A existência de uma alta homologia entre os genes *CYP21*, pode estar na origem

de emparelhamentos desiguais durante a meiose, possibilitando o surgimento de *crossing-over* desiguais, originando deleções, duplicações e conversões e/ou transferência de sequências deletérias do pseudogene para o gene ativo³⁹⁻⁴¹.

Esta doença apresenta um modo de transmissão autossômica recessiva, por isso uma criança que receba duas mutações patogénicas do gene terá uma perda enzimática total ou quase total, e por consequência terá a forma clássica perdedora de sal com virilização (ou ambiguidade sexual no sexo feminino), por excesso de produção dos esteroides suprarrenais que não requerem a atividade da enzima. Caso receba apenas uma mutação grave com preservação de pelo menos 1 a 5% da atividade da enzima, poderá apresentar a forma virilizante simples sem perda de sal. Por fim, caso apresente uma mutação menos grave, em que a enzima apresenta cerca de 20 a 50% da sua atividade, a criança será portadora de uma forma não clássica de HCSR, com sinais de androgenização que pode aparecer em idade escolar ou até mesmo na adolescência^{23,42}.

Desta forma, o fenótipo varia de acordo com o grau de déficit enzimático, havendo ainda uma boa correlação entre o genótipo e o fenótipo, comprovada em cerca de 90% nas formas perdedoras de sal, sendo mais baixa nas formas virilizante simples (70-75%) e não clássicas (45-65%)^{43,44}.

Não obstante, existem muitos polimorfismos no gene *CYP21* com normal função enzimática^{10,45}.

Ainda assim, a correlação genótipo-fenótipo não é de 100%, o que pode sugerir a influência de outros genes e de fatores ambientais no aparecimento de manifestações clínicas. Para além disso, a variação na biossíntese do cortisol e a sensibilidade aos androgénios também apresentam relevância nas manifestações clínicas da doença^{10,21}.

Em suma, os doentes em geral, são heterozigóticos compostos, ou seja, apresentam mutações diferentes em cada um dos alelos, sendo a forma clínica determinada pelo alelo com maior atividade enzimática⁴⁶.

1.5.5. Diagnóstico bioquímico

A alteração bioquímica mais característica da HCSR por deficiência de 21-hidroxilase é o aumento da 17 α -hidroxiprogesterona, o principal substrato desta enzima. Este aumento, também pode ser observado na deficiência em 11 β -hidroxilase, mas não em outros tipos desta doença^{47,48,49}.

A 17 α -hidroxiprogesterona também é produzida na placenta, por isso também podem ser observados valores elevados no sangue do cordão umbilical e no sangue de recém-nascidos saudáveis, quando a colheita é efetuada nas primeiras horas de vida, no entanto esta concentração baixa rapidamente após as 48 horas de vida. Em comparação, em bebés com HCSR, os níveis deste metabolito tendem a manter-se elevados ou a aumentar^{47,50,51}.

A Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica recomenda o estabelecimento dos valores de referência para a 17-OHP, em função da idade gestacional, nomeadamente para recém-nascidos pré-termo (<37 semanas de gestação): ≤ 60 nmol/L e valores ≤ 30 nmol/L para recém-nascidos de termo (≥ 37 semanas de gestação)^{52,53}.

Os doentes de HCSR clássica apresentam geralmente, valores basais da 17-OHP (valores normais de 17-OHP no organismo, medidos em condições de repouso) que geralmente excedem 10000 ng/dL (>300 nmol/L), embora cerca de 10% dos recém-nascidos doentes possam apresentar níveis inicialmente normais, no período neonatal (figura 6). Já, na forma não clássica, a 17-OHP basal pode ser normal ou ligeiramente elevada, no entanto após prova de estimulação com a ACTH sintética, esta apresenta um aumento significativo (1500 a 10000 ng/dL) (figura 6)^{30,41}.

Podem ainda ser encontradas outras alterações analíticas tais como o aumento da progesterona, 17-hidroxipregnenelona, 21-deoxicortisol, androstenediona e testosterona. Além disso, o aumento da atividade da renina plasmática (PRA) e a diminuição do rácio aldosterona/PRA indica um défice na síntese da aldosterona, permitindo assim a diferenciação entre a forma clássica perdedora de sal e a forma virilizante simples, depois do período neonatal^{30,54}. Não obstante, é de mencionar que o diagnóstico da forma clássica de HCSR, no sexo feminino, é geralmente feito ao nascimento, dada a presença de ambiguidade dos órgãos

genitais. Caso a suspeita surja durante a gestação, é possível efetuar o diagnóstico, através da medição dos níveis de 17α -Hidroxiprogesterona presentes no líquido amniótico^{55,56}.

Perante a suspeita da forma não clássica, deve ser efetuado o doseamento da 17-OHP basal pela manhã (preferencialmente pelas 8h). Nas mulheres, em idade fértil, este doseamento deve ser efetuado no início da fase folicular (no primeiro dia de cada ciclo menstrual), já que o corpo lúteo produz 17-OHP, podendo originar falsos positivos, caso a colheita seja efetuada durante a fase lútea (após a ovulação). Este rastreio também pode ser importante em mulheres com história familiar de HCSR ou caso pertença a uma etnia em que esta doença seja muito prevalente^{57,58}.

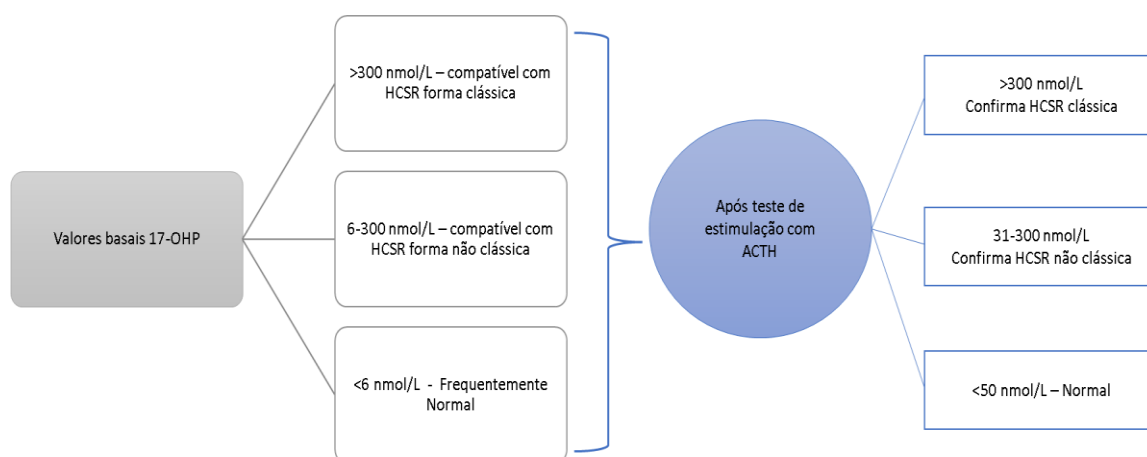


Figura 6. Diagnóstico bioquímico da Hiperplasia Congénita das suprarrenais⁵⁹.

1.5.6. Diagnóstico precoce

O rastreio neonatal visa a deteção de várias doenças no período pré sintomático, tendo em vista a instituição de terapêutica precoce adequada, com claros benefícios para o recém-nascido. A integração de uma determinada doença no programa de rastreio neonatal deve obedecer a determinados critérios, entre os quais é possível destacar: a existência de um marcador bioquímico económico, com elevada sensibilidade e especificidade, aplicável para a identificação da doença no período pré-sintomático, a existência de tratamento eficaz para a doença, com maior probabilidade de sucesso quando iniciado antes do aparecimento de

sintomas e por fim ter uma frequência e custo relação/ benefício concebíveis em termos de saúde pública^{60,61}.

Em meados de 1960, J.M.G. Wilson e G. Junger procederam à compilação de um conjunto de critérios que visam determinar a adequação para o estabelecimento de programas de rastreio. Atualmente ainda é considerado um clássico da literatura na área da Saúde Pública^{62,63}.

Em Portugal, o rastreio neonatal teve início no final de 1979, com o rastreio da Fenilcetonúria. Mais tarde, foi incluído o Hipotiroidismo Congénito (1981)^{60,64}.

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), caracteriza-se por um programa de Saúde Pública sistemático, desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge. Este, é de participação voluntária e financiado pelo Estado, na sua totalidade. A sua taxa de cobertura é de cerca de 99,9%, o que reflete uma forte adesão⁶⁴⁻⁶⁶.

Atualmente, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), usualmente conhecido por “teste do pezinho”, inclui o Hipotiroidismo Congénito, a Fibrose Quística, a Drepanocitose e mais 24 Doenças Hereditárias do Metabolismo⁶⁵. A Hiperplasia Congénita das Suprarrenais não se encontra incluída, no entanto, em 1989, foi efetuado um rastreio experimental, onde foram estudados 100.000 recém-nascidos⁶⁷. Nele, foram encontrados 21 casos de recém-nascidos que apresentaram valores de 17-OHP superiores a 30 nmol/L, sete dos quais foi confirmado o diagnóstico de HCSR, porém, o tempo médio de início de tratamento era elevado na altura (cerca de 19 dias), o que não permitia antecipar o aparecimento de sintomas, fazendo com que em apenas dois casos se tenha antecipado o diagnóstico clínico. Tudo isto, levou a que não houvesse implementação e alargamento deste rastreio a todos os recém-nascidos, em Portugal⁶⁷. Atualmente o tempo médio de início de tratamento ronda os 10 dias de vida.

A nível mundial, já são vários os países que incluem a Hiperplasia Congénita das Suprarrenais no rastreio neonatal, tendo em vista, essencialmente, a identificação da forma clássica com perda de sal e a virilizante simples, verificando-se uma significativa diminuição da morbidade e mortalidade associadas^{15,68}. Neste caso, o rastreio, além de permitir a rápida administração do tratamento adequado (uso de mineralocorticoides ou glicocorticoides), prevenindo crises de perda de sal e morbimortalidade associada, possibilita a correta classificação do género em recém-nascidos do sexo feminino com virilização dos órgãos genitais externos e o diagnóstico precoce da forma virilizante simples, evitando a hiperandrogenização durante a infância^{69,70}.

Segundo Elena Iñiguez *et al*, nos países onde se realiza o rastreio da HCSR, registou-se uma melhoria na taxa de sobrevivência, verificando-se uma maior incidência desta doença no sexo feminino. Além disso, a possibilidade de prevenção da hiponatremia, evita problemas futuros de atraso de desenvolvimento e de aprendizagem. Outro benefício relatado, tal como mencionado anteriormente, é diminuição do tempo de atribuição correta do sexo⁶⁹.

Nos programas de rastreio neonatal conhecidos, é utilizado como marcador primário a 17-hidroxiprogesterona, dado que a sua conversão em 11-desoxicortisol e da progesterona em 11-desoxicorticosterona, que são precursores do cortisol e da aldosterona, respetivamente, é promovida pela ação da 21-hidroxilase. Dado que, a 17-OHP está presente em níveis elevados no soro de recém-nascidos com défice de 21-hidroxilase, é possível detetá-la e quantificá-la a partir de amostras de sangue seco^{15,71,72}.

A concentração da 17-OHP em recém-nascidos depende do peso, idade, prematuridade e até do facto se tratar de gémeos. Por recomendação do *Working Group on Neonatal Screening of the European Society for Paediatric Endocrinology* (Grupo de Trabalho de Rastreio Neonatal da Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica), os valores de referência para bebés de termo é inferior ou igual a 30 nmol/L. Já, valores entre os 30 e os 90 nmol/L requerem uma nova avaliação e quando são superiores 90 nmol/L é sugestivo de HCSR. Já, para recém-nascidos pré-termo (27-36 semanas), o valor de referência para este marcador é inferior ou igual a 60 nmol/L^{47,52,53}.

Assim, o rastreio neonatal da HCSR inclui um teste de rastreio principal em que é feito o doseamento da 17-OH-progesterona por fluoroimunoensaio de resolução temporal em sangue seco em papel, de recém-nascidos entre os 3 e os 6 dias de vida. Todavia, a utilização da 17-OHP como marcador primário do rastreio desta doença resulta num elevado número de falsos positivos, devido a reações cruzadas de metabolitos precursores deste esteroide, verificadas principalmente nas primeiras 48h após o nascimento e em recém-nascidos pré-termo e/ou de baixo peso (valor preditivo positivo de 1,4%, segundo Gidlöf, *et al*.) ou até mesmo devido a patologias associadas, stress e variação biológica. Inclusivamente, em alguns países, foi relatado que cerca de 100 recém-nascidos são examinados desnecessariamente para cada caso de HCSR detetado^{73,74}.

Por outro lado, Houang M. *et al*, confirmou que a ingestão materna de corticosteroides inalatórios durante a gravidez, pode ser um fator a ter em conta, já que pode diminuir os níveis de 17-OHP, contribuindo para a perda de diagnóstico desta patologia. Por outro lado, o uso de espironolactona, pode contribuir para a obtenção de um resultado falso positivo⁷⁵.

Além disto, estão também descritos, ainda que com uma frequência rara, a obtenção de resultados falsos negativos para a forma clássica virilizante simples, originando o atraso de diagnóstico⁷⁵.

No sentido de mitigar este problema, foram implementadas em alguns países, provas de segundo nível (provas efetuadas sobre a amostra inicial de rastreio, após o doseamento do marcador primário) recorrendo a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). Assim, o doseamento de metabolitos como a 17-OHP, androstenediona (A4), 11-desoxicortisol (11-D), 21-desoxicortisol (21-D), cortisol (F) e particularmente, o uso da razão (17-OHP+A4)/F, fornecem informações adicionais importantes, melhorando significativamente a especificidade do protocolo e por consequência o seu valor preditivo positivo^{25,76}.

Num estudo experimental, na Nova Zelândia, Mark R. de Hora *et al*, recorreu a um teste de primeiro nível, no qual é doseada a 17-OHP em amostras de sangue seco em papel por fluoroimunoensaio de resolução temporal, colhidas entre as 48 e 72h de vida. Para recém-nascidos com peso ≤ 1500 g, é efetuado uma segunda colheita com 2 semanas de vida e caso tenham peso ≤ 1000 g é ainda realizada uma terceira colheita com 1 mês de vida. Neste método, valores de 17-OHP superiores a 27 nmol/L e superiores a 37 nmol/L para recém-nascidos com peso ≤ 1500 g, são considerados fora dos valores de referência e por isso submetidos a provas de segundo nível por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, diminuindo assim o número de falsos positivos e por consequência a inespecificidade do protocolo^{19,25}.

Segundo o teste de segundo nível, por LC-MS/MS de Lacey *et al*, a grande maioria de falsos positivos, apresentavam um pico de cortisol substancial. Já, em casos confirmados de HCSR, verifica-se uma diminuição do cortisol, enquanto a 17-OHP, androstenediona, estão aumentados (figura 7). Por sua vez, em casos de HCSR por défice de 21-hidroxilase, verifica-se um aumento da 21-desoxicortisol, por outro lado, em casos de HCSR por défice de 11- β -hidroxilase, verifica-se um aumento de 11-desoxicortisol^{76,77}.

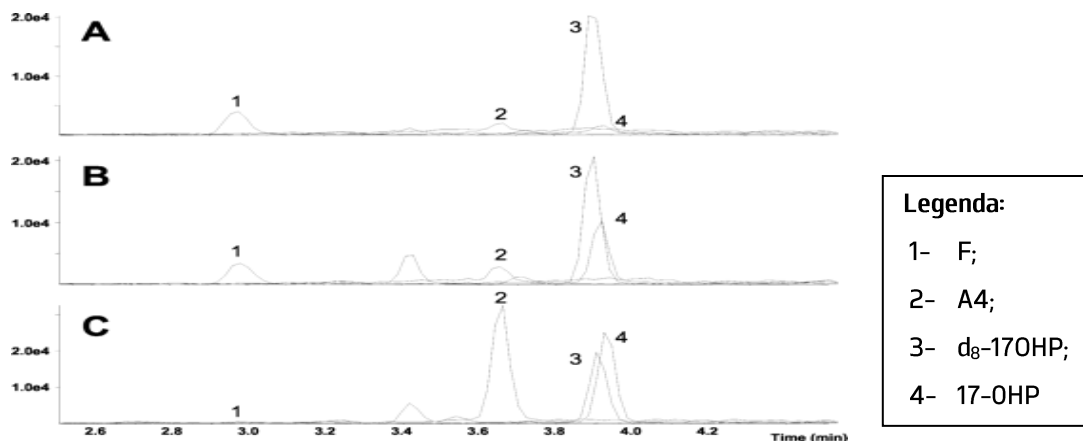


Figura 7. Perfil de esteroides por LC-MS/MS, num controlo normal (A), num falso-positivo por fluoroimunoensaio (B) e num caso confirmado de HCSR (C)⁷⁷.

Tendo em conta o método desenvolvido por Janzen N. *et al*, este permite a quantificação de 17-OHP sem reações cruzadas e do marcador, considerado mais importante na deteção da HCSR por défice de 21-hidroxilase. É ainda de salientar, que nos casos em que os valores de 21-D não estão acima do limite normal, torna-se ainda mais importante o cálculo da razão $(21-D+17-OHP) / F$, que em casos de HCSR por défice de 21-hidroxilase, apresenta-se significativamente elevada⁷⁶.

Por outro lado, um estudo efetuado por Hora MR *et al*, demonstrou que a razão $(17-OHP + A4) / F$ foi semelhante em RN de termo e/ou com peso superior ou igual a 2500g. Já nos RN pré-termo, verificou-se um aumento transitório da 17-OHP, motivado pela expressão tardia da 11- β -hidroxilase, responsável pela conversão do 21-D em F. Além disso, uma taxa relativamente alta da síntese de precursores da 17-OHP só é efetuada numa fase mais tardia da gravidez, e por consequência a conversão da 17-OHP e da A4, o que explica o aumento da razão $(17-OHP+A4) / cortisol$ em RN com peso baixo e com idade gestacional menor. É de destacar ainda que a aproximação dos RN pré-termo à idade gestacional de termo, a involução fetal das glândulas suprarrenais e a normalização da esteroidogénese pós-natal, acompanhada do aumento da atividade da enzima 11- β -hidroxilase, podem explicar a diminuição da 17-OHP e da razão anteriormente mencionada, em RN com idade gestacional superior a 36 semanas²⁵.

Alguns estudos, apontam ainda que quando é aplicada a razão (17OHP+A4) /cortisol com um cutoff entre 2.5 e 3.75, diminui significativamente o número de falsos negativos. Por outro lado, segundo Hora M., e de forma a reduzir o número de falsos positivos e com um baixo risco de diminuir a sensibilidade do teste, em RN de baixo peso e RN pré-termo, é aconselhado o estabelecimento do cutoff de 2,3, já nos RN com peso normal é de 1,4 e de 0,7 em bebês de termo²⁵. Neste estudo, foram ainda calculadas as médias e intervalos de referência para os parâmetros anteriormente mencionados, que estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Média e intervalos de referência das concentrações de esteroides (nmol/L), pelo método LC-MS/MS para casos normais e casos confirmados de HCSR, segundo Hora M²⁵.

	Controlo Normal		Doentes HCSR	
	Média	Intervalo de referência (nmol/L)	Média	Intervalo de Referência (nmol/L)
17-OHP (LC-MS/MS)	12	<1 – 161	467	112-1422
A4	6	<1 – 113	244	32-875
F	75	<1 – 6319	42	28-77
(17OHP+A4) /F	0,27	<0,01-9,23	14,3	1,36-99,00

1.5.7. Tratamento

No início da década de 50, Wilkins e Bartter demonstraram pela primeira vez os benefícios da administração de corticoides no tratamento da HCSR. A partir daí, o prognóstico destes doentes tem melhorado significativamente, com a taxa de mortalidade a diminuir drasticamente. Os estudos posteriores têm-se focado essencialmente na importância do seguimento dos pacientes a longo prazo e nas implicações de um diagnóstico precoce e da correta monitorização do tratamento⁴².

O tratamento aplicado, além de substituir as hormonas em déficit como o cortisol e aldosterona (forma clássica perdedora de sal), também tem como objetivo, o restabelecimento da retroalimentação negativa sobre a ACTH, culminando na diminuição da estimulação das glândulas suprarrenais por este metabolito e conseqüentemente a redução da síntese de androgénios suprarrenais¹⁸.

Assim, o tratamento administrado a casos de HCSR por déficit de 21-OH assenta essencialmente em dois princípios: a correção dos défices hormonais e supressão da secreção excessiva de androgénios⁷⁷.

A administração de hidrocortisona é a mais utilizada na correção do déficit de cortisol. Já para a substituição do déficit de aldosterona, é administrada essencialmente a 9-alfa-fludrocortisona¹⁸.

A terapêutica adequada, deve ser administrada imediatamente após a confirmação do diagnóstico, sendo que deve ser ajustada à condição clínica de cada doente. É ainda de salientar, que quando o diagnóstico da HCSR é feito através do rastreio neonatal ou pela observação de virilização no sexo feminino, e sem sinais de desidratação ou de transtornos digestivos, a administração pode ser feita via oral. No caso da hidrocortisona, inicialmente são administradas doses de 50 mg/m²/dia, sendo progressivamente ajustada para uma dose de manutenção de 25 mg/m²/dia. Já a fludrocortisona é iniciada com doses de 25µg, duas vezes por dia, devendo a dosagem ser ajustada em função das características clínicas e biológicas de cada doente, sendo estas avaliadas a partir da análise do ionograma sanguíneo e da determinação analítica da renina^{18,78}.

Ao longo da vida, estes doentes devem efetuar terapia de substituição hormonal para o tratamento da insuficiência suprarrenal e de forma a diminuir os níveis elevados de androgénios, proporcionando assim, crescimento e puberdade normais¹⁸.

Desta forma, em crianças maiores, a hidrocortisona administrada como terapia de substituição de glicocorticóides, é dividida em duas ou três doses de 10-15 mg/m²/dia, com doses maiores durante a manhã. Na puberdade, normalmente é necessário aumentar a dose deste tratamento, havendo a necessidade de uma vigilância clínica mais consistente. Relativamente à terapêutica com 9-alfa-fludrocortisona para substituição de mineralocorticóides, as doses variam consoante a idade do indivíduo (50-100 µg/dia), e em função da renina^{79,80}.

Em doentes até aos 2 anos de idade, com a forma perdedora de sal, é necessária a ingestão de 1-2 g/dia de sódio. A partir daí, essa ingestão é assegurada através da alimentação.

Já, particularmente, em condições de stress, como por exemplo: febre, transtornos gastrointestinais ou acidentes, a dosagem de hidrocortisona deve ser monitorizada, sendo que por norma, a dose é aumentada para o dobro ou o triplo da habitual. O esforço físico e intelectual,

normalmente não requer o dobro da dosagem comum. Já, no caso da 9-alfa-fudrocortisona, a dose não deve ser aumentada à margem das descompensações hidroeletrólíticas⁷⁸⁻⁸⁰.

O sobretratamento com glicocorticóides pode provocar características do Síndrome de Cushing e o excesso de mineralocorticóides pode originar hipertensão arterial. Assim, o acompanhamento por uma equipa multidisciplinar, incluindo endocrinologistas pediátricos, cirurgiões, ginecologistas e psicólogos, assume particular importância¹⁸.

Em diagnósticos efetuados durante a gravidez, e no caso de o feto ser do sexo feminino, com risco de desenvolver a forma clássica de HCSR, é possível iniciar tratamento pré-natal, através da administração de dexametasona. Quando este tratamento é administrado antes da nona semana de gestação, evita a produção excessiva de androgénios, e por consequência a ambiguidade genital nas meninas. Já, se não for possível o diagnóstico, antes do nascimento, é efetuado uma vaginoplastia, ainda durante o primeiro ano de vida⁸¹.

O tratamento das formas não clássicas está recomendado apenas, quando se verifica pubarca precoce e rápida progressão da maturação óssea com possíveis implicações na estatura final. Em indivíduos assintomáticos, não é recomendado o início da terapêutica e quando iniciada, deverá ser descontinuada após resolução dos sintomas. Têm indicação para terapêutica de stress aqueles que estão sob crioterapia e por isso com possibilidade de supressão do eixo adrenal⁵⁹.

Por fim, é importante referir que os doentes, particularmente aqueles com as formas mais severas, devem ser encaminhados para centros de referência, sendo particularmente importante que em caso de necessidade de cirurgia, esta seja efetuada por equipas médicas com experiência, dado o impacto que esta pode ter na qualidade de vida futura dos indivíduos afetados. Além disto, a transição para a vida adulta deve ser discutida e planeada entre o paciente e a equipa médica, sendo muito importante que a informação transmitida seja clara e de fácil compreensão para que haja o melhor acompanhamento possível destes doentes, também por parte dos seus familiares⁸⁰.

2. Objetivos

Estabelecer valores de referência para o doseamento da 17- α -OH-progesterona (marcador primário da HCSR) em sangue seco em papel de filtro, numa população de recém-nascidos portugueses, tendo por base a idade gestacional e/ou peso;

Implementar as provas de segundo nível para a análise de 17-OHP, cortisol, androstenediona, 21-desoxicortisol, 11-desoxicortisol, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), em sangue em papel, no laboratório do Programa Nacional de Rastreio Neonatal.

3. Métodos

3.1. Seleção de amostras

Foi realizado um estudo observacional descritivo transversal, no qual foi efetuado o doseamento da 17 α -Hidroxiprogesterona em amostras residuais de sangue seco em papel de filtro de 1724 recém-nascidos.

Para este estudo, foram utilizadas amostras de sangue seco em papel de filtro recolhidas dos recém-nascidos rececionadas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge para efeitos de rastreio neonatal entre 2020 e 2023. As amostras foram analisadas anonimizadas. Para isso, foram definidos critérios de inclusão, nomeadamente: idade na altura da colheita entre os 3 e os 6 dias de vida, menção da idade gestacional no cartão de Guthrie, quantidade suficiente de amostra disponível e o seu bom estado de conservação.

Além disso, foram excluídas as amostras que apresentavam informação clínica de outras patologias, de forma a minimizar possíveis interferências. Foram igualmente analisadas amostras de dois positivos para deficiência em 21-hidroxilase.

3.2. Doseamento da 17- α -OH-progesterona

3.2.1. Fluoroimunoensaio de fase sólida de resolução temporal

O protocolo para o doseamento 17 α -OH-progesterona em amostras de sangue seco em papel de filtro do tipo 903™ Whatman®, teve por base as recomendações do kit DELFIA® 17 α -OH-progesterona da Perkin Elmer (Turku Finlândia).

O princípio deste método assenta numa reação de competição entre a 17-OHP marcado com európio (eu) e a 17-OHP da amostra para um número limitado de locais de ligação com anticorpos policlonais específicos para a 17-OHP de coelho. Para facilitar a libertação da 17-OHP das proteínas a que está ligada é utilizado danazol⁴⁷.

A revestir a fase sólida é utilizado um segundo anticorpo, dirigido contra a IgG de coelho, de forma a separar convenientemente os anticorpos ligados e os antigénios livres.

Para dissociar os iões de európio do antigénio marcado é usada uma solução intensificadora, posteriormente estes formam quelatos fluorescentes com os componentes dessa solução. Por fim, é efetuada a medição da fluorescência de cada poço, que é inversamente proporcional à quantidade de 17-OHP da amostra⁴⁷.

3.2.2. Procedimento Experimental

Após a seleção das amostras, cortou-se 1 pequeno disco de sangue seco em papel de filtro de 3,2 mm de diâmetro para microplacas de 96 poços (figura 8), de forma a dosear a 17 α -OH-progesterona de cada amostra. Os calibradores e controlos de qualidade utilizados foram disponibilizados pelo kit DELFIA® 17 α -OH-progesterona da Perkin Elmer (Turku, Finlândia). De seguida pipetou-se 100 μ l de uma solução antissoro anti-17-OHP previamente preparada para cada poço. Agitou-se lentamente durante 5 minutos recorrendo a um agitador automático. Posteriormente, foram adicionados 100 μ l de uma solução de marcador európio - 17-OHP em cada poço e agitou-se durante 1 minuto. De seguida, as microplacas foram cobertas e colocadas a incubar durante 18 a 22 horas a uma temperatura entre os 2 e os 8 °C⁷.

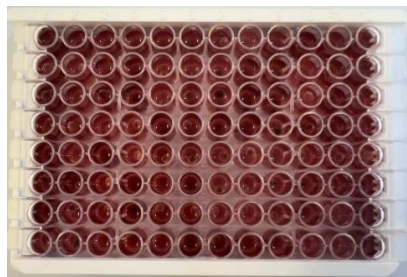


Figura 8. Microplaca de 96 poços, após adição dos discos de sangue seco em papel, correspondentes aos calibradores, controlos, amostras e soluções recomendadas.

Após a incubação, a solução e os discos de papel de filtro foram removidos e os poços lavados com recurso ao DELFIA® *Washer – Diskremove* (figura 9). Por fim, adicionou-se 200 µl de solução intensificadora (*Enhancement solution*) a cada poço e agitou-se novamente a microplaca durante 5 minutos. A fluorescência foi medida no fluorímetro de resolução temporal VICTOR™ D⁴⁷.

3.3. Otimização das provas de segundo nível

3.3.1. Cromatografia líquida acoplada a espetrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

A espetrometria de massa é uma técnica analítica utilizada na identificação, caracterização e quantificação de compostos químicos, tendo por base as suas massas moleculares e padrões de fragmentação⁸³.

A aplicação de LC-MS/MS, permite maximizar o seu poder analítico, pois apresenta uma capacidade de deteção elevada e muito específica⁸³.

Na espetrometria de massa em tandem, com analisadores triplo quadrupolo, existem dois quadrupolos analisadores, separados pelo que é na prática uma célula de colisão (figura 9). Vários tipos de configuração de ativação dos 3 quadrupolos são possíveis, em função do resultado pretendido. Para a análise baseada em MRM (monitorização de reações múltiplas), a mais utilizada para ensaios qualitativos, no primeiro quadrupolo é selecionado o ião com base na sua razão massa/carga e depois passando para o segundo quadrupolo, onde vai sofrer fragmentação, fragmentação esta que é dependente da estrutura química do ião. No

quadrupolo 3, será selecionado o fragmento considerado mais específico da molécula a quantificar⁸³.

O acoplamento de um espectrómetro de massa com um sistema de cromatografia líquida, nomeadamente HPLC, resulta num sistema analítico de elevada seletividade e sensibilidade^{76,83}.

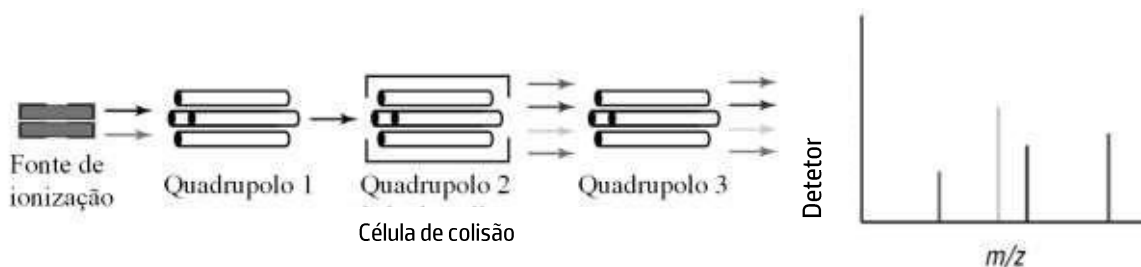


Figura 9. Representação do método espectrometria de massa (LC-MS/MS)⁸³.

3.3.2. Procedimento Experimental

A otimização do procedimento experimental contemplou várias fases: a extração da amostra, separação cromatográfica e deteção no espectrómetro de massa. No que diz respeito à extração, inicialmente seguiu-se o procedimento descrito por Janzen *et al.*⁷⁶ Na tentativa de melhorar a recuperação, que era insuficiente, e conseqüentemente a sensibilidade foram testadas novas combinações de solução de extração, tendo a opção final recaído por uma solução de acetonitrilo: água a 80:20 (vol/vol) que conduziu a um aumento médio de recuperação de 1,9 vezes. O método de extração ficou o seguinte: para uma microplaca de 96 poços, foram cortados, dois discos de 3,2 mm de diâmetro de sangue seco em papel de filtro do tipo 903™ Whatman®, equivalente a 6,2 µl de sangue total, de cada um dos calibradores e amostras a testar, para cada poço. Posteriormente adicionou-se a cada poço, 100 µl de uma solução de água para HPLC plus, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil Cedex, França): Acetonitrilo hypergrade for LC – MS, LiChrosolv® da Merck (Darmstadt, Alemanha) a 80:20 (vol/vol) com d₈-17OHP a 4µg/mL. Agitou-se a microplaca durante 50 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, transferiu-se o sobrenadante para outra microplaca e com recurso a um concentrador Techne® Dri-Block® DB3-A, secou-se o conteúdo a uma temperatura entre os 60 e os 70 °C.

Por fim, adicionou-se 100 µL de uma solução metanol para LC/MS, Carl Erba Reagents S.A.S Reagents (Val de Reuil Cedex, França) e água para HPLC plus, Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil Cedex, França) a 50:50 (vol/vol) com 0,01% de ácido fórmico 98-100% da Merck (Darmstadt, Alemanha). Agitou-se, vigorosamente, durante 30 minutos, num agitador de placas.

De forma a determinar quais as melhores condições cromatográficas, que permitiam separar os vários compostos a detetar, foram testadas várias colunas com diferentes matrizes, tendo a opção final recaído pela coluna AAA C18 Column 4.6 x 150 mm da AB Sciex (Foster City, EUA), que apresentou a melhor resolução para os compostos em causa. A análise por cromatografia líquida foi realizada pelo equipamento HPLC Agilent 110 series (Santa Clara, EUA), tendo sido a separação cromatográfica efetuada à temperatura ambiente. A fase móvel A é água para LC-MS/MS + 0,01% ácido fórmico e a fase móvel B metanol para LC-MS/MS + 0,1% ácido fórmico. O volume de injeção foi de 25 µl e o tempo de corrida de cromatografia líquida foi de 17 min e o as variações do gradiente da bomba de LC, ao longo da corrida estão representadas na tabela 5.

Tabela 5. Variações do gradiente da bomba de LC, ao longo da corrida.

Tempo total (min)	Fluxo (µl/min)	Fase Móvel. A (%)	Fase Móvel B (%)
0.00	400	80,0	20,0
1.50	400	80,0	20,0
2.00	400	30,0	70,0
3.00	400	15,0	85,0
3.10	400	15,0	85,0
8.10	400	15,0	85,0
9.00	400	80,0	20,0
17.00	400	80,0	20,0

A espectrometria de massa em tandem (MS/MS), foi efetuada pelo equipamento API4000QTRAP da Sciex, com as condições representadas na tabela 6.

Tabela 6. Condições de espectrometria de massa.

Gás cortina	10
Gás de colisão	Médio
Voltagem	5500,0
Temperatura (°C)	400,0
Gás 1	30,0
Gás 2	30,0

Efetuiu-se testes de otimização de fragmentação para os vários metabolitos em estudo, nomeadamente a 17-OHP, d_8 -17-OHP, F, A4, 21-D e 11-D. Para isso, houve a necessidade de ajustar as condições para cada um deles, de forma a obter os iões dos padrões de fragmentação pretendidos, tal como representados na tabela 7. Neste processo, foram validados os diferentes parâmetros, nomeadamente, Potencial de desagrupamento (DP), Potencial de entrada (EP), Energia de colisão (EC) e Potencial de saída da célula de colisão (CXP) de forma a otimizar a fragmentação do ião inicial, no fragmento específico selecionado em Q3 (tabela 8).

Tabela 7. Massas correspondentes a cada metabolito em estudo, nos quadrupolos.

ID Metabolito	Massa Q1 (m/z)	Massa Q3 (m/z)
17-OHP	331.3	97.1
D_8-17-OHP	339.3	100.1
21-Deoxicortisol	347.3	121.1
11-Deoxicortisol	347.2	109.2
Cortisol	363.2	121.0
Androstenediona	287.2	97.1

Legenda: Q1- Quadrupolo 1; Q3- Quadrupolo 3

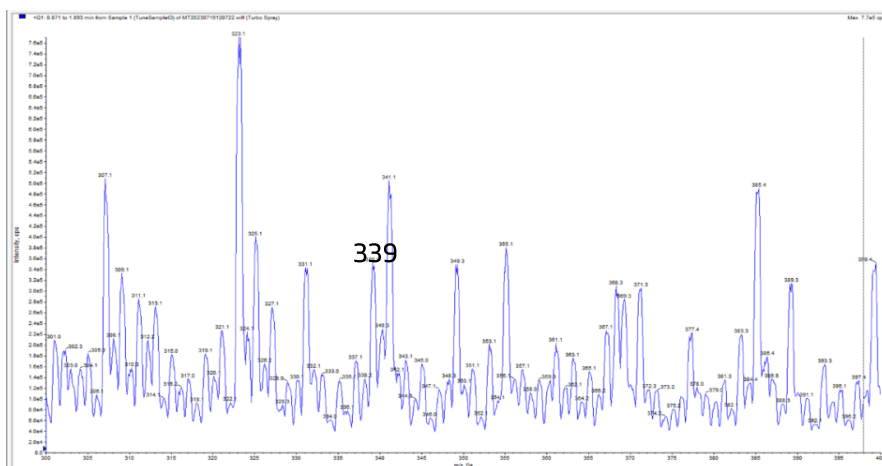
Tabela 8. Condições de fragmentação utilizadas.

	17-OHP	F	4-A	21-D	11-D	d ₈ -17-OHP
DP (volts)	81	81	81	91	96	81
EP (volts)	10	10	10	10	10	10
CE (volts)	40	25	31	35	40	34
CxP (volts)	2	22	16	4	18	2

Legenda: DP – Potencial de desagrupamento; EP– Potencial de entrada; CE – Energia de colisão; CxP – Potencial de saída da célula de colisão; 17-OHP – 17-Hidroxiprogesterona; F- cortisol; 4-A – Androstenediona; 21- D – 21-deoxicortisol; 11-D – 11-deoxicortisol; d₈-17-OHP- deutero de 17-hidroxiprogesterona;

Após efetuar os ajustes de forma a obter as condições cromatográficas ideais de cada metabolito, para a técnica em estudo, essas mesmas condições foram aplicadas para as diferentes amostras de controlo de qualidade externo e amostras.

Como exemplo, nas figuras 10,11 e 12, encontra-se representado todo o processo e testes de fragmentação do d₈-17-OHP.



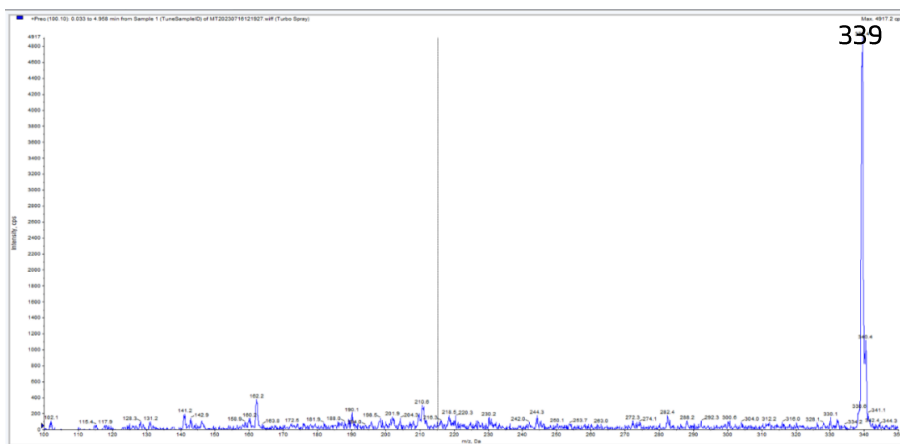


Figura 11. Condições onde não existe fragmentação do d8 -17-OHP (339 m/z).

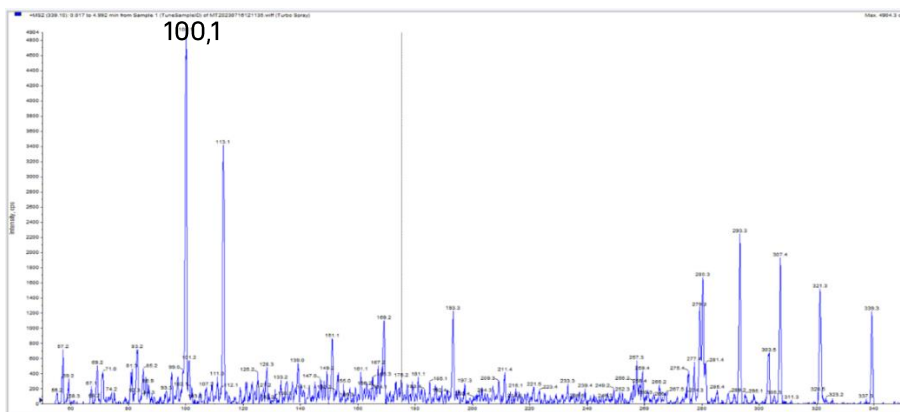


Figura 12. Condições finais com fragmentação do d8 – 17-OHP (ião filho de referência 100,1 m/z).

Ao longo do processo de elaboração do protocolo experimental da prova de segundo nível, foi necessário efetuar algumas alterações, relativamente ao protocolo inicialmente previsto, que se revelaram importantes para uma maior uma maior sensibilidade do método. Entre elas, é de destacar a substituição do metanol da CARLO ERBA Reagents S.A.S (Val de Reuil Cedex, França) pelo metanol da Merck (Darmstadt, Alemanha), dado que com a utilização do primeiro, obtinha-se uma linha de base alta que interferia de forma muito significativa na sensibilidade dos metabolitos que pretendemos quantificar.

3.4. Tratamento dos dados

Após a seleção de amostras, estas foram agrupadas tendo em conta a idade gestacional e peso, de acordo com as recomendações do Comité Nacional de Normas Laboratoriais Clínicas dos Estados Unidos da América (NCCLS).

Os dados (nº de identificação, idade na altura da colheita, peso, idade gestacional e posteriormente os resultados do doseamento da 17-OHP) foram registados no programa Microsoft Excel®. No mesmo programa, foram criados gráficos de dispersão, de forma a facilitar a observação da tendência dos valores obtidos para cada subgrupo da idade gestacional e peso. De seguida, para validar a divisão dos subgrupos em estudo, recorreu-se à aplicação do método de Lahti, para as duas variáveis em estudo.

Seguindo o método de Lahti⁸⁴, primeiramente, calculou-se o desvio padrão (sd) de 17-OHP de cada subgrupo e estabeleceu-se que se:

- O quociente R dos desvios padrão (o maior a dividir pelo menor) dos subgrupos que se pretende comparar, era $R > 1,5$, realizou-se a divisão dos mesmos;
- $R < 1,5$, calculou-se as diferenças entre o percentil 1, denominado de limite de referência baixo (LRB) e o percentil 99, nomeado de limite de referência alto (LRA), da 17-OHP dos subgrupos em comparação. Utilizou-se apenas o desvio padrão menor dos subgrupos, como escala (s), para aplicar os seguintes critérios:

1. se ambos LRB e LRA fossem $< 0,25s$, não se realizava a divisão;
2. se LRB, LRA ou ambos fossem $\geq 0,75s$, realizava-se a divisão;
3. se LRB ou LRA estivessem dentro do intervalo $[0,25s; 0,75s]$ e nenhuma fosse superior ou igual a $0,75s$, recorria-se a outros critérios que não os meramente estatísticos.

Após a divisão dos subgrupos, elaborou-se gráficos diagrama caixa, para que fosse possível analisar a distribuição dos valores obtidos para cada subgrupo. Tendo em vista o estabelecimento dos valores de referência para 17-OHP de cada subgrupo, foi calculado o percentil 99,5.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Na primeira fase deste estudo, foram analisadas de forma anonimizada, um total de 1724 amostras residuais de sangue seco em papel de filtro rececionadas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, para efeitos de rastreio neonatal. Entre as amostras selecionadas, em que foi disponibilizada a informação relativa ao género (n=1674), 51,4% são do sexo masculino (n=861), enquanto que 48,6% (n=813) eram do sexo feminino. Relativamente à idade na altura em que foi efetuada a colheita, a média situou-se em $4,3 \pm 1,0$ dias, para um total de 1724 amostras estudadas. Por fim, e no que diz respeito à idade gestacional, a média é de $35,2 \pm 3,6$ semanas (n=1724), já no que diz respeito ao peso, a média é de $2372 \pm 864,2$ gramas (n = 1678).

4.2. Valores de referência da 17-OH-Progesterona

A variação das concentrações de 17-OH-progesterona observadas nas amostras de sangue seco de indivíduos saudáveis, tendo em conta a idade gestacional e o peso, estão representadas nas figuras 10 e 11, respetivamente, expressas em nmol/L, unidade frequentemente utilizada para a quantificação deste metabolito e recomendada pela casa comercial Perkin Elmer®, fornecedora do kit utilizado.

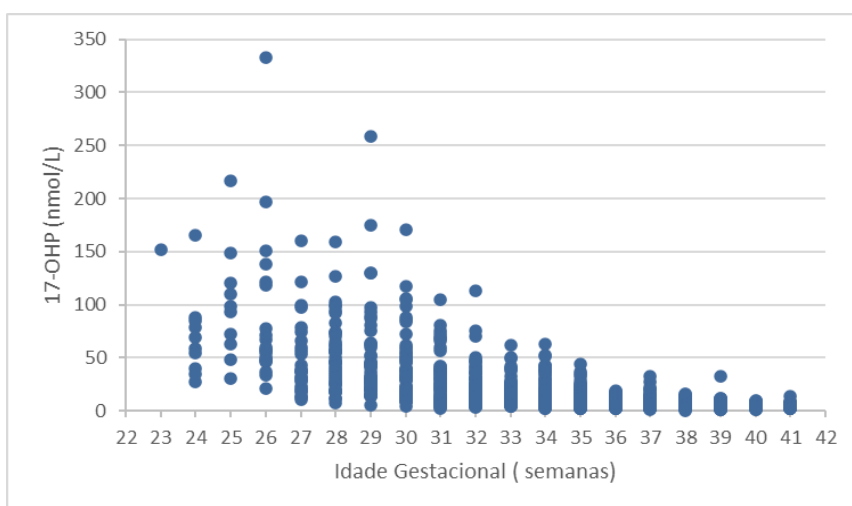


Figura 13. Variação da concentração de 17-OHP (nmol/L), em função da idade gestacional.

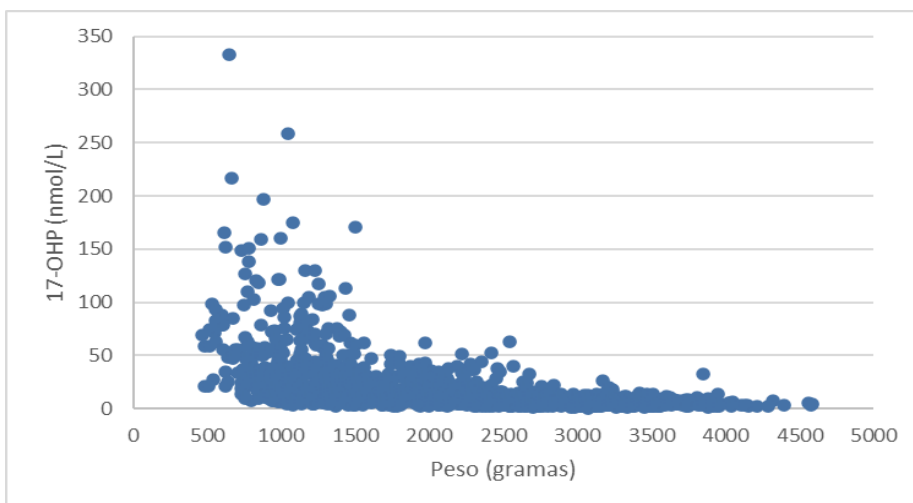


Figura 14. Variação da concentração de 17-OHP (nmol/L), em função do peso.

A análise das figuras 13 e 14 sugere que, as concentrações de 17-OHP em amostras de sangue seco, em recém-nascidos com menor peso e idade gestacional, podem atingir valores superiores a 90 nmol/L (valor de referência para prematuros, descrito pela literatura). É ainda possível inferir que existe uma tendência relativamente à variação das concentrações deste metabolito, que se apresenta maior, quanto menor for o peso e/ou a idade gestacional.

Assim, de maneira a otimizar os valores de referência para a 17-OHP, em recém-nascidos, foi necessário avaliar, qual das duas variáveis reflete melhor a variabilidade dos níveis deste metabolito. Isto permite, o aumento da sensibilidade e especificidade do rastreio neonatal do défice em 21-hidroxilase.

Para definir os grupos para os valores de referência de 17-OHP (em função da idade gestacional e peso) adequados, é primordial que o nível deste metabolito seja homogéneo. Para isso, foram seguidas as recomendações do Comité Nacional de Normas Laboratoriais Clínicas dos Estados Unidos da América (NCCLS).

Tendo em vista o ajuste dos subgrupos aos valores obtidos previamente, recorreu-se à análise do gráfico de dispersão da figura 13, que demonstra a variabilidade dos valores de 17-OHP, em função da idade gestacional. Neste, é possível perceber a importância de definir um subgrupo por cada semana de gestação, juntando apenas as 33 e as 34 semanas e as superiores a 37 semanas, tendo em conta o método de Lahti. Já para a constituição dos subgrupos consoante o peso, teve-se por base a análise da figura 14 que indica uma grande variabilidade de valores

deste metabolito, aproximadamente até às 1750 g, sendo também o intervalo onde se verifica os valores mais elevados, o que torna de particular importância a avaliação deste subgrupo (<1750g). Além disso, verificou-se que os intervalos [2250g; 2500g], [2500g;3000g] e >3000g, apresentam uma dispersão dentro da mesma faixa de valores. Assim tornou-se relevante avaliar se é importante a sua divisão.

Na tabela 9 encontram-se sintetizados, os subgrupos definidos, em função da idade gestacional e peso, que se pretende analisar.

Tabela 9. Subgrupos para os níveis de 17-OHP, em função da idade gestacional e peso, em análise.

Idade gestacional (semanas)	Peso (gramas)
<31	<1750
31-33	1750-2250
33-35	2250-2500
35-36	2500-3000
36-37	>3000
37-38	
38-39	
>39	

Os resultados obtidos após aplicação do método de Lahti para a divisão adequada dos subgrupos tendo em conta a idade gestacional e o peso, estão descritos nas tabelas 10 e 11, respetivamente.

Tabela 10 . Aplicação do Método de Partição de Lahti, para a divisão dos subgrupos em função da idade gestacional (IG), para os níveis de 17-OHP.

IG (semanas)	n	SD	R	P1	P99	LRA	LRB	0,25s	0,75s	P. de Lahti
<31	231	45,07	1,73	15,00	211					Divisão
31-33	140	26,02		5,98	95,41					
31-33	140	26,02	2,32	5,98	95,41					Divisão
33-35	211	11,21		6,08	52,60					
33-35	211	11,21	1,74	6,08	52,60					Divisão
35-36	176	6,45		4,43	34,93					
35-36	176	6,45	1,52	4,43	34,93					Divisão
36-37	166	4,24		3,91	21,94					
36-37	166	4,24	0,87	3,91	21,94	4,09	0,52	0,88	2,65	Divisão
37-38	282	3,67		3,39	17,85					
37-38	282	3,67	1,41	3,39	17,85	4,06	0,50	0,65	1,95	Divisão
38-39	279	2,60		2,89	13,79					
38-39	279	2,60	1,10	2,89	13,79	2,01	0,46	0,65	1,95	Divisão
>39	239	2,87		2,43	11,78					

Legenda: IG-Idade Gestacional; n -amostra; R-quociente; SD-Desvio Padrão; P-Percentil; LRA- Limite de referência alto; LRB- Limite de referência baixo;

Tabela 11. Aplicação do Método de Partição de Lahti, para a divisão dos subgrupos em função do peso, para os níveis de 17-OHP.

Peso(g)	n	SD	R	P1	P99	LRA	LRB	0,25s	0,75s	P. de Lahti
<1750	443	39,06	3,88							Divisão
1750-2250	220	10,07								
1750-2250	220	10,07	1,17	1,93	47,80	5,02	0,43	2,15	6,44	S/Divisão
2250-2500	167	8,58		3,51	42,78					
2250-2500	167	8,58	1,73							Divisão
2500-3000	387	4,96								
2500-3000	387	4,96	1,57							Divisão
>3000	461	3,17								

Legenda: n -amostra; R-quociente; SD-Desvio Padrão; P-Percentil; LRA- Limite de referência alto; LRB- Limite de referência baixo;

Desta forma, os subgrupos definitivos, em função da idade gestacional e do peso, que resultaram desta avaliação estão representados na tabela 12.

Tabela 12. Subgrupos definitivos para os níveis de 17-OHP, em função da idade gestacional e peso.

Idade Gestacional (semanas)	Peso (gramas)
<31	<1750
31-33	1750-2500
33-35	2500-3000
35-36	>3000
36-37	
37-38	
38-39	
>39	

Para demonstrar a distribuição dos valores de 17-OHP, nos subgrupos conforme a idade gestacional e o peso, foram elaborados diagramas de caixa, que se encontram representados nas figuras 15 e 16, respectivamente. Estes, demonstraram que existe uma grande variabilidade para os níveis do metabolito em estudo, tendo em conta essas mesmas variáveis (idade gestacional e peso), daí a necessidade de ajustar os valores de referência para cada um desses subgrupos.

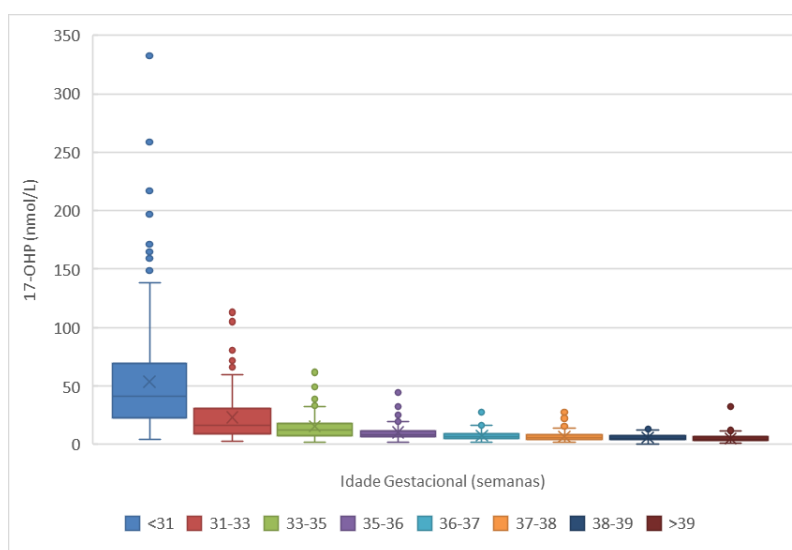


Figura 15. Diagrama de caixa representativo da dispersão dos valores de 17-OHP, nos subgrupos em função da idade gestacional.

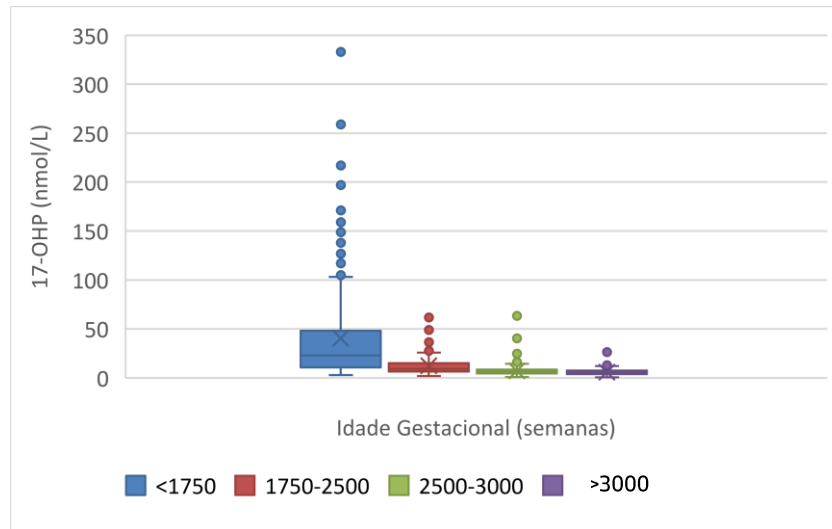


Figura 16. Diagrama de caixa representativo da dispersão dos valores de 17-OHP, nos subgrupos em função do peso.

De forma a otimizar o ajuste dos valores de referência para a 17-OHP, utilizou-se o percentil 99,5, da população saudável em estudo e tendo em conta os subgrupos previamente definidos, em função da idade gestacional e do peso. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 13 e 14, respetivamente.

Tabela 13. Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função da idade gestacional.

Grupos	Idade gestacional (semanas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
I	<31	252,70
II	31-33	107,49
III	33-35	61,16
IV	35-36	38,03
V	36-37	28,43
VI	37-38	20,30
VII	38-39	14,94
VIII	>39	13,28

Tabela 14. Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função do peso.

Grupos	Peso (gramas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
A	<1750	212,80
B	1750-2500	51,08
C	2500-3000	32,67
D	>3000	12,97

4.3. Provas de segundo nível

Após otimização do protocolo para as provas de segundo nível, este foi aplicado a amostras de controlo externo de qualidade, amostras de recém-nascidos normais, recém-nascidos com aumentos transitórios de 17-OHP (falsos positivos) e duas amostras de doentes com HCSR. A título de exemplo, estão representados a seguir os cromatogramas correspondentes à amostra do controlo de qualidade externo (figura 17), um controlo normal (figura 18), um doente de HCSR (figura 19) e uma amostra falso positivo (figura 20).

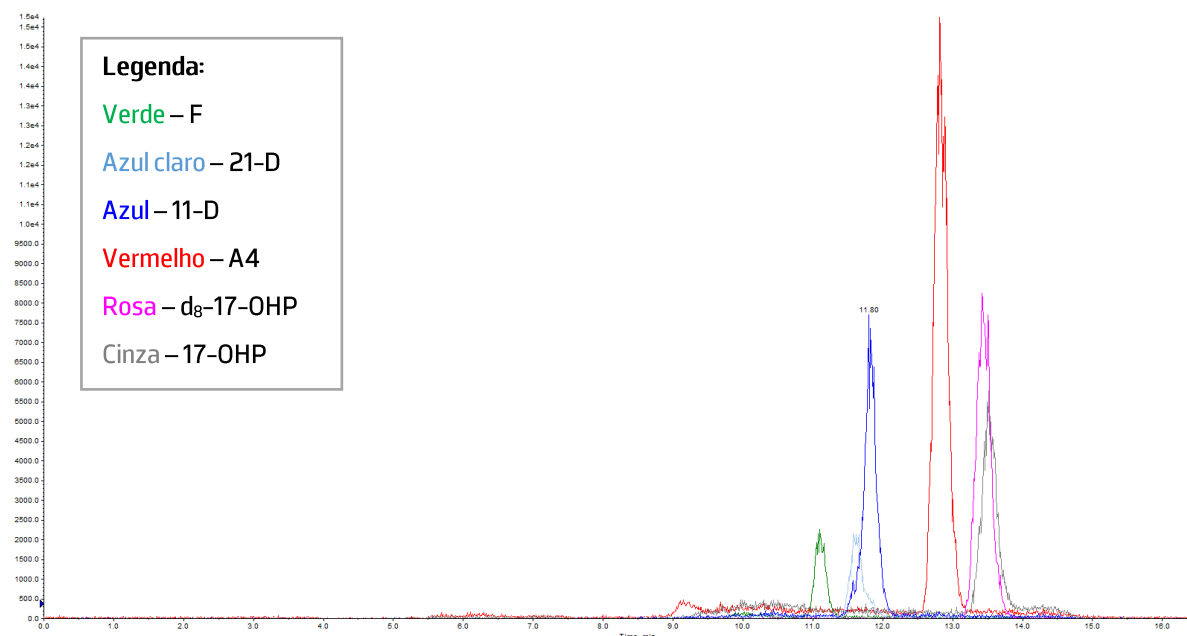


Figura 17. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de uma amostra fornecida pelo controlo de qualidade externo – CDC.

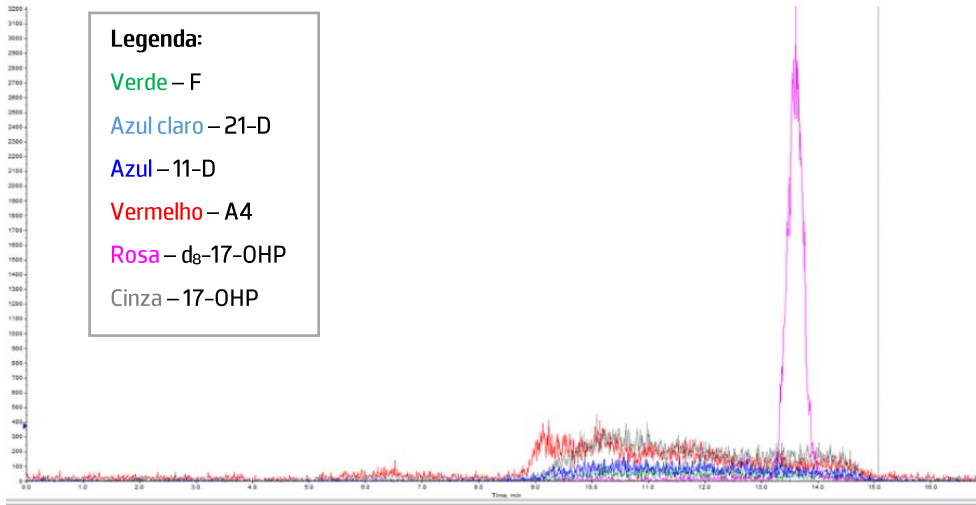


Figura 18. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de um controlo normal.

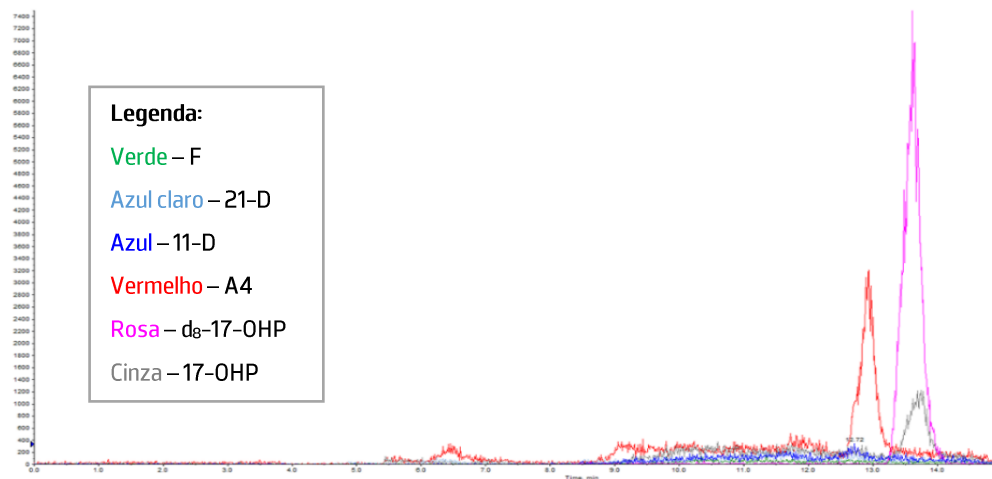


Figura 19. Perfil cromatográfico de esteroides obtido de um caso positivo para HCSR.

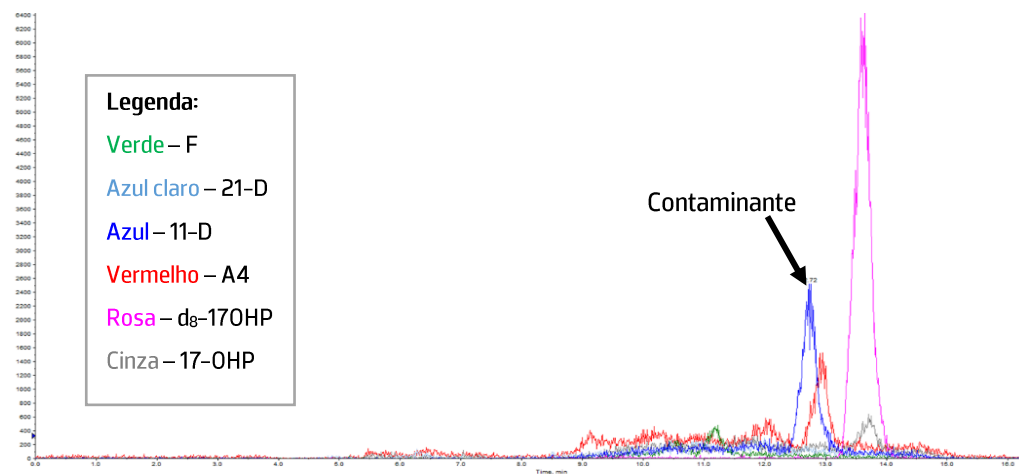


Figura 20. Perfil cromatográfico de esteroides de um caso falso positivo para HCSR.

4.3.1. Quantificação

Com o intuito de obter resultados quantitativos, foram construídas curvas de calibração para cada um dos metabolitos em estudo. Para isso, utilizou-se calibradores, obtidos através da sobrecarga efetuada sobre amostras reais, fornecidos por um laboratório parceiro (Apêndice 1) e o $d_8-17OHP$ como padrão interno.

Como estes calibradores foram produzidos efetuando sobrecargas sobre amostras reais e devido ao facto de a concentração basal não estar aferida, cria dificuldades na quantificação dos valores mais baixos, nomeadamente nos metabolitos onde é expectável a existência de quantidades endógenas relevantes. A dificuldade em quantificar os valores de concentrações mais baixos, especialmente de cortisol (Apêndice 2) (figura 21), levou a que a possibilidade de utilização destes calibradores possibilidade fosse descartada.

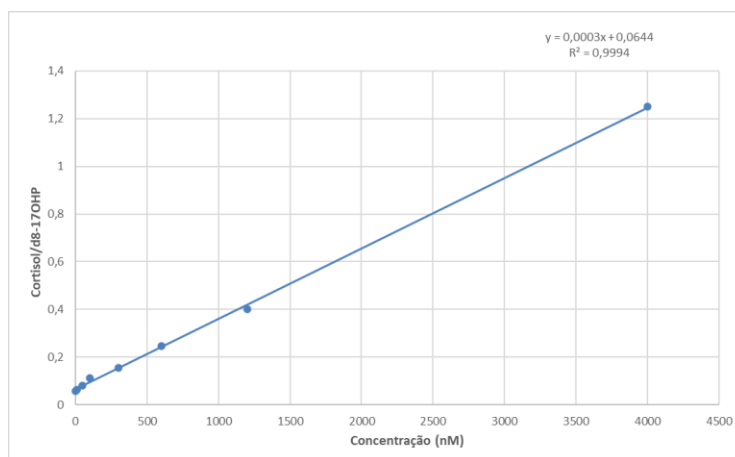


Figura 21. Curva de calibração do cortisol, a partir dos calibradores do laboratório parceiro.

De forma a contornar estas limitações, recorreu-se às amostras do programa de controlo de qualidade do Centro para Controlo de Doença e Prevenção (CDC), para a construção das curvas de calibração, para todos os metabolitos em estudo, uma vez que estes tinham todos os valores de concentração aferidos e validados.

Em todas as curvas de calibração, verificou-se um coeficiente de correlação (r^2) muito próximo de 1, o que permite inferir que o modelo utilizado é adequado. Os resultados obtidos (Apêndices 3,4, 5,6 e 7) e respectivas curvas de calibração para cada um dos metabolitos em estudo, estão representadas nas figuras que se seguem (figuras. 22,23,24,25 e 26).

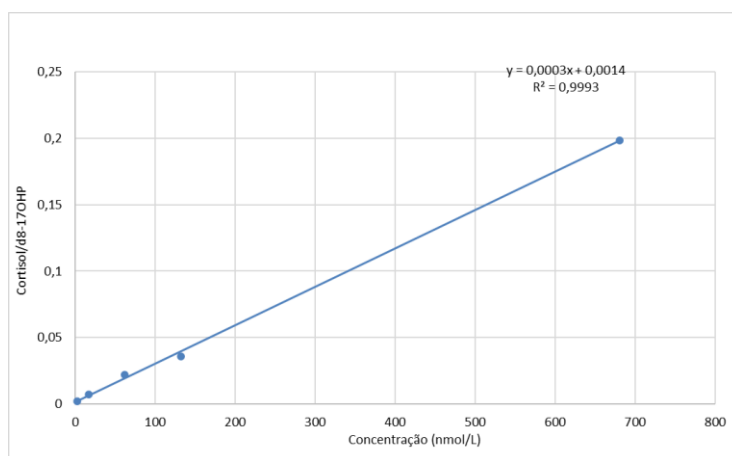


Figura 22. Curva de calibração do cortisol – CDC ($r^2=0,9993$).

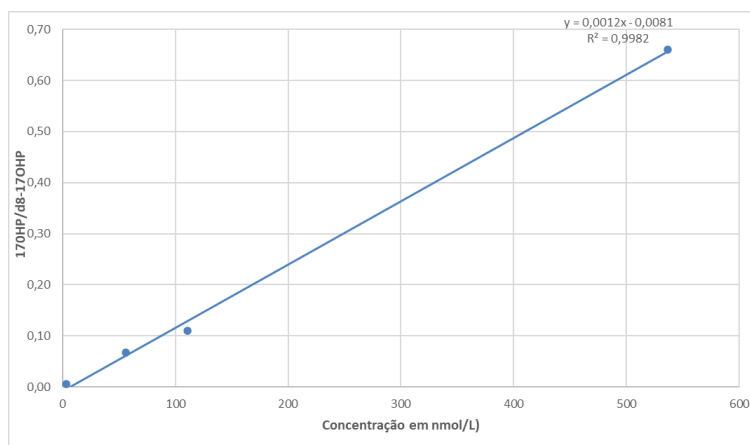


Figura 23. Curva de calibração da 17-OHP – CDC ($r^2=0,9982$).

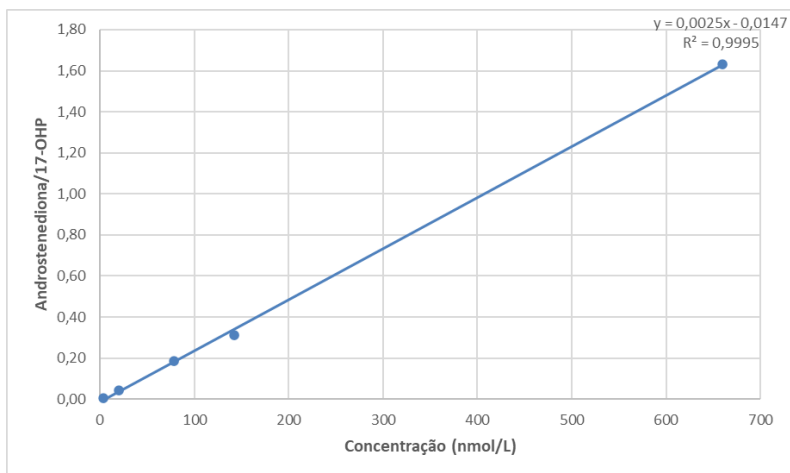


Figura 24. Curva de calibração da A4 – CDC ($r^2=0,9995$).

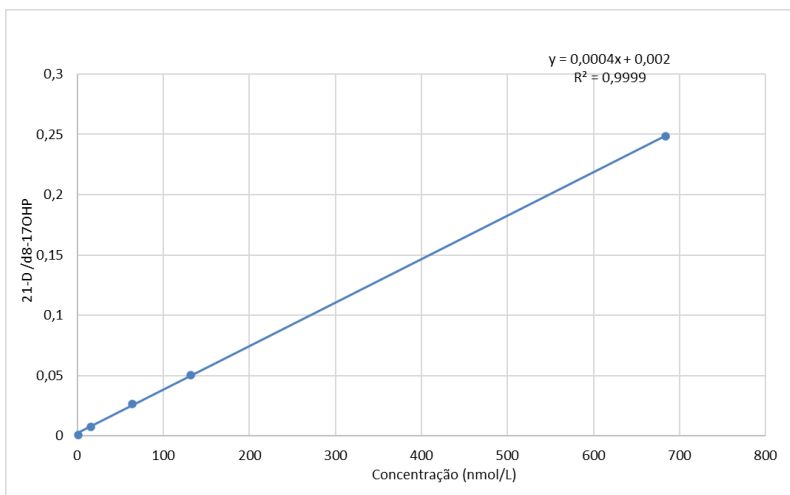


Figura 25. Curva de calibração do 21-D – CDC ($r^2=0,9999$).

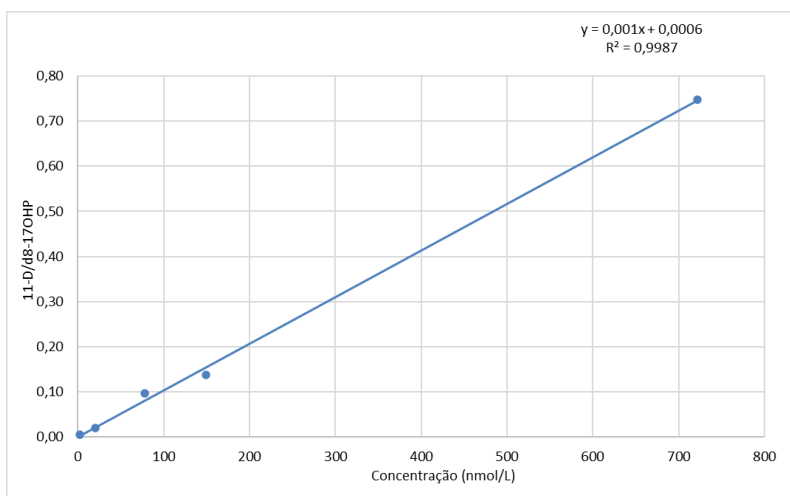


Figura 26. Curva de calibração do 11-D – CDC ($r^2=0,9987$).

De forma a verificar a validade da abordagem, foram testadas amostras de 2 pacientes confirmados com HCSR, falsos positivos e amostras normais. Relativamente aos casos positivos, os valores obtidos estão na tabela 15. Pese embora não tenham sido analisados indivíduos normais (tabela 16) em número suficiente para a definição de valores de referência para todos os parâmetros, foi efetuada uma comparação dos valores obtidos neste grupo com os indivíduos doentes e com os falsos positivos.

Nos dois indivíduos doentes testados, o parâmetro que se veio a demonstrar uma maior variação em relação aos normais, foi a razão $(17\text{-OHP}+\text{A4}) / \text{F}$. Temos, no entanto, que ter em consideração que sendo amostras com vários meses, poderá ter havido alguma degradação das mesmas.

Tabela 15. Resultados das provas de segundo nível em casos confirmados de HCSR.

Amostra	A	B
Idade Gestacional (semanas)	37	41
17-OHP (DELFI) (nmol/L)	457,00	228,00
17-OHP(LCMS/MS) (nmol/L)	155,14	128,27
F (nmol/L)	9,22	48,14
A4 (nmol/L)	156,21	69,63
$(17\text{-OHP}+\text{A4}) / \text{F}$ (nmol/L)	33,83	4,15
21-D (nmol/L)	27,16	46,92
11-D (nmol/L)	5,50	5,78

Legenda: a negrito foram salientados os valores expetavelmente fora do intervalo da normalidade, por comparação com a variação nos indivíduos normais (tabela 16).

Tabela 16. Resultados das provas de segundo nível em recém-nascidos de termo, em que foram obtidos valores normais de 17-OHP no fluoroimunoensaio.

Amostra	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Idade Gestacional (semanas)	38	40	38	39	39	40	38	37	40
17-OHP(LCMS/MS) (nmol/L)	20,31	14,33	28,98	22,23	28,91	28,80	30,73	21,11	18,68
F (nmol/L)	166,28	45,47	25,79	97,69	14,13	73,93	31,15	24,24	69,88
A4 (nmol/L)	10,10	8,00	10,29	9,81	9,39	8,12	10,53	12,93	8,42
(17-OHP+A4) /F (nmol/L)	0,18	0,49	1,52	0,33	2,71	0,50	1,32	1,40	0,39
21-D (nmol/L)	15,37	6,85	20,14	7,54	5,18	7,48	22,36	16,70	15,52
11-D (nmol/L)	6,83	3,48	6,53	5,79	5,31	4,80	9,02	4,99	8,02

Posteriormente, foram testadas amostras de recém-nascidos pré-termo, em que se verificou, no fluoroimunoensaio, valores altos de 17-OHP e que normalizaram em segundas amostras (colhidas no âmbito do protocolo de prematuros do Programa Nacional de Rastreio Neonatal, não sendo por isso casos positivos de HCSR (tabela 17).

Nestes casos, observa-se no geral, valores mais aumentados de F e A4, nas amostras com valores de 17-OHP altos na prova de primeiro nível, do que nos controlos normais (tabela 18). Não obstante, o que permite afirmar que não se tratam de doentes, é o valor normal resultante da razão (17-OHP+A4) /F, que não se verifica em casos positivos de HCSR.

Tabela 17. Resultados das provas de segundo nível em alguns casos, em que se obteve valores mais elevados de 17-OHP, no fluoroinmunoensaio, em RN pré-termo.

Amostra	I	II	III	IV	V
Idade Gestacional (semanas)	26	28	27	32	27
17-OHP (LCMS/MS) (nmol/L)	89,10	75,51	77,81	41,96	292,13
F (nmol/L)	134,92	186,29	217,85	100,99	2388,98
A4 (nmol/L)	16,27	73,00	25,46	23,84	80,93
(17-OHP+A4) /F (nmol/L)	0,78	0,80	0,47	0,65	0,16
21-D (nmol/L)	29,15	52,20	125,48	14,01	545,00
11-D (nmol/L)	5,18	7,59	0,93	5,01	57,30

Legenda: a negrito foram salientados os valores expetavelmente fora do intervalo da normalidade, por comparação com a variação nos indivíduos normais (tabela 18).

Tabela 18. Resultados das provas de segundo nível em alguns casos, em que foram obtidos valores normais de 17-OHP no fluoroinmunoensaio, em RN pré-termo

Amostra	VI	VII	VIII	IX
Idade Gestacional (semanas)	28	26	30	27
17-OHP (DELFIA) (nmol/L)	19,40	21,20	39,30	56,50
17-OHP (LCMS/MS) (nmol/L)	18,54	16,83	22,92	45,72
F (nmol/L)	19,11	38,84	62,32	27,70
A4 (nmol/L)	7,49	9,71	13,08	7,61
(17-OHP+A4) /F (nmol/L)	1,36	0,67	0,58	1,93
21-D (nmol/L)	14,05	29,28	1,67	18,12
11-D (nmol/L)	2,19	9,09	9,91	5,30

5. Discussão

A partir da análise dos valores de 17-OHP, obtidos por fluoroimunensaio, verifica-se que a média de valores da concentração da mesma é mais elevada no grupo com idade gestacional inferior a 31 semanas e com peso inferior a 1750 gramas, observando-se uma tendência decrescente à medida que a idade gestacional e peso aumentam.

O Grupo de Trabalho de Rastreamento Neonatal da Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica recomenda o estabelecimento de valores de referência para a 17-OHP ajustados à idade gestacional, em que para RN de termo deverá ser ≤ 30 nmol/L, valores entre 30 e 90 nmol/L requerem nova avaliação, já valores >90 nmol/L são sugestivos de HCSR. No que diz respeito aos recém-nascidos pré-termo (27-36 semanas), o valor de referência para este marcador é < 60 nmol/L^{52,53}.

No entanto, entre os vários programas de rastreamento de HCSR, existem algumas divergências, nomeadamente, relativamente ao método de quantificação a usar, idade de colheita, o ajuste dos valores de referência em função do peso ou idade gestacional e respetiva estratificação dos subgrupos. Por isso, é aconselhado que cada programa estabeleça essas especificidades, conforme a sua realidade.

Neste estudo, verificou-se que deverá ser feita uma estratificação mais restrita no que diz respeito à idade gestacional e/ou peso. Assim, após aplicação do método de Lahti para a divisão dos subgrupos e posterior cálculo do percentil 99,5 é sugerido que para RN pré-termo com idade gestacional <31 semanas que o valor de referência seja $\leq 252,70$ nmol/L; entre as 31 e as 33 semanas $\leq 107,49$ nmol/L; entre as 33 e as 35 semanas $\leq 61,6$ nmol/L; e por fim entre as 35 e as 36 semanas $\leq 38,03$ nmol/L. Já para os RN de termo (>36 semanas de gestação), os valores de referência situaram-se entre $\leq 28,43$ nmol/L em RN entre as 36 e as 37 semanas e $\leq 13,28$ nmol/L para RN >39 semanas.

Alguns estudos sugerem que a existência de morbilidades associadas, como a dificuldade respiratória, insuficiência renal, situações de stress, nomeadamente causadas por complicações durante o parto e particularmente a prematuridade (no qual se verifica uma diminuição da expressão fisiológica de enzimas envolvidas na via metabólica da 17-OHP, como a 21-hidroxilase e 11- β -hidroxilase), são fatores preponderantes que levam ao aumento

transitório da 17-OHP. Facto esse, que é apoiado pelos valores obtidos neste estudo na população de prematuros/baixo peso. Estes fatores, contribuem ainda para a alta taxa de falsos positivos (FP) registada nos programas de rastreio neonatal^{85,86,87}.

A alta taxa de FP, principalmente nos recém-nascidos pré-termo e de baixo peso acarreta gastos económicos superiores a 10 vezes o gasto de uma amostra considerada normal, acrescentando ainda a avaliação clínica, muitas vezes desnecessária, assim como ansiedade gerada nas famílias⁸⁸.

Segundo Gidlöf *et al.*, em aproximadamente 26 anos de rastreio neonatal da HCSR na Suécia, o valor preditivo positivo para recém-nascidos de termo foi de 25% enquanto para prematuros foi de apenas 1,4%, indiciando assim uma forte correlação com a idade gestacional⁷³. No entanto, e apesar de não existirem padrões universais de estratificação de recém-nascidos, a maioria dos laboratórios opta pelo ajuste dos valores de referência em função do peso ao nascimento, apesar de se verificar uma correlação melhor entre a idade gestacional e os níveis de 17-OHP⁷³. Aliás, sabe-se que boa parte desses programas que utilizam como variável de ajuste dos valores de referência, o peso ao nascimento, é justificado pelo facto que o fornecimento da informação relativa à idade gestacional ser menos fiável e por isso, o uso do peso ao nascimento torna-se mais eficaz nesses casos⁸⁹.

Outro aspeto a ter em conta é que os níveis de 17-OHP são normalmente elevados após o nascimento, registando-se uma diminuição significativa nos primeiros dias de vida, em RN saudáveis, o que reforça a definição de valores de referência ajustados à realidade de cada Programa de Rastreio Neonatal, nomeadamente no que diz respeito à idade em que é efetuada a colheita da amostra. Por outro lado, em doentes de HCSR por défice de 21-hidroxilase, os níveis de 17-OHP aumentam ao longo do tempo⁸⁸. Assim, a sensibilidade da deteção desta doença é mais limitada nos primeiros dois dias de vida, havendo uma melhoria significativa da sensibilidade e valor preditivo positivo, quando é feita a repetição desta análise, numa segunda amostra colhida após alguns dias. No entanto, esta estratégia conduziria a um atraso de deteção das formas graves, e à impossibilidade de antecipar o diagnóstico clínico⁹⁰.

De acordo com Sarafoglou *et al.*, tem sido proposto que os recém-nascidos prematuros, efetuem mais duas repetições do teste de rastreio neonatal, com 2 e 4 semanas de vida, de forma a reduzir falsos positivos⁹¹. Uma estratégia para evitar as colheitas seriadas que atrasam

o diagnóstico e que seja possível o aumento da especificidade e sensibilidade é a utilização das provas de segundo nível que são efetuadas sobre a amostra inicial do rastreio neonatal. É frequente recorrer-se a provas de segundo nível por LC-MS/MS, através do doseamento de marcadores secundários, nomeadamente, 17-OHP, A4, F, 21-D e 11-D e da aplicação da razão $(17\text{OHP LC-MS/MS} + \text{A4}) / \text{F}^{25}$. Tendo em consideração a importância das provas de segundo nível para a eficácia da abordagem laboratorial ao rastreio da HCSR foi levado a cabo a sua implementação na Unidade de Rastreio de Neonatal, Metabolismo e Genética (URN), o laboratório do Programa Nacional de Rastreio Neonatal. Os resultados obtidos revelam uma sensibilidade e coeficientes de correlação (r^2) adequados à quantificação de qualquer um dos metabolitos.

A prova de segundo nível, torna-se assim particularmente importante em casos em que se verificam valores aumentados de 17-OHP, na prova de primeiro nível mesmo após aplicação dos valores de referência em função da idade gestacional. Neste estudo, por exemplo a amostra V, com 27 semanas de idade gestacional, em que no fluoroimunoensaio foi obtido um valor de 17-OHP de 579 nmol/L, ou seja, um caso presuntivamente positivo, após aplicação da prova de segundo nível verificaram-se valores altos, no geral, para todos os parâmetros em estudo, no entanto quando aplicada a razão anteriormente mencionada, verifica-se que esta é compatível com um caso normal. Assim, este caso é um potencial falso positivo, sendo este aumento da 17-OHP, secundário ao quadro clínico do RN e não motivada pela HCSR devido ao défice da enzima 21-hidroxilase. De certa forma, isto corrobora a utilização da razão $(17\text{OHP LC-MS/MS} + \text{A4}) / \text{F}$ como parâmetro mais informativo das provas de segundo nível.

Além disso, é possível afirmar, pela análise dos dois casos positivos e casos de RN pré-termo com valores altos, que se verifica um decréscimo da concentração da 17-OHP, relativamente ao fluoroimunoensaio, que pode ser motivado pelo facto de as amostras em questão serem relativamente antigas (tempo após colheita superior ou igual a 6 meses), e por isso a qualidade da amostra esteja afetada e/ou pela eliminação de reações de cruzadas, pela utilização da técnica de LC-MS/MS.

6. Conclusão

Neste estudo, foram aferidos valores de referência para 17-OHP, em sangue seco em papel de filtro, ajustados à idade gestacional e peso para uma população de recém-nascidos em Portugal. Foi igualmente implementada a quantificação dos compostos 17-OHP, cortisol, androstenediona, 21-desoxicortisol, 11-desoxicortisol, por LC-MS/MS, em sangue em papel.

Da análise dos resultados obtidos e do seu enquadramento com a informação disponível na bibliografia, sugere-se a seguinte estratégia de rastreio da HCSR: inicialmente efetua-se o doseamento de 17-OHP por fluoroimunoensaio e a sua avaliação deve ser feita mediante a utilização de valores de referência ajustados à idade gestacional (estudos sugerem melhor correlação com a concentração de 17-OHP). Quando se verifica valores de 17-OHP superiores ao valor de referência, os casos são considerados suspeitos para HCSR e por isso, devem ser submetidas a provas de segundo nível, em que é avaliado um perfil de esteroides pelo método LC-MS/MS. Caso se verifique, um perfil de esteroides típico de HCSR, os casos são considerados positivos e remetidos para centros clínicos de referência para avaliação clínica e provas confirmatórias.

A realização deste projeto não encerra esta linha de estudo. Aliás este, suscita questões que futuramente será importante aclarar, como por exemplo calcular valores de referência para os metabolitos envolvidos nas provas de segundo nível, em função do peso e/ou idade gestacional.

Referências Bibliográficas

1. Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke DP. Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism [Internet]. 2009 Apr 1;23(2):181–92.
2. John Hopkins Medicine. Adrenal Glands. Johns Hopkins Medicine Health Library. 2019
3. Podgórski R, Aebischer DA, Stompor M, Podgórska D, Mazur A. Congenital Adrenal Hyperplasia: clinical symptoms and diagnostic methods. Acta Biochimica Polonica. 2018 May 27;65(1):25–33.
4. Strott CA. The search for the elusive adrenal steroidogenic “regulatory” protein. Trends Endocrinol Metab .1990 Jul 1;
5. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. J Lipid Res 52, 2111–2135. 2011
6. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr Rev 32, 81–151. 2011
7. Rhéaume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5- delta 4- isomerase in human adrenals and gonads. Mol Endocrinol 5, 1147–1157. 1991.
8. Chung BC, Picado-Leonard J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE, Miller WL. Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 407–411 (1987).

9. Miller WL. Androgen synthesis in adrenarche. *Rev Endocr Metab Disord* 10, 3–17. 2009.
10. Hiperplasia congénita da suprarrenal não clássica – aspetos relevantes para a prática clínica [Internet]. www.spedmjournal.com. [cited 2022 May 7]. Available from: <http://www.spedmjournal.com/section.php?id=68>
11. Cinnamon VanPutte, Regan J, Russo A. *Anatomia e Fisiologia de Seeley – 10ª Edição*. McGraw Hill Education; 2016.
12. Nykanen P, Heinonen K, Riepe FG, Sippell WG, Voutilainen R Serum concentrations of adrenal steroids and their precursors as a measure of maturity of adrenocortical function in very premature newborns. *Horm Res Paediatr* 74, 358–364, 2010.
13. Pasqualini JR. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 401–415, 2005.
14. Delle Piane L, Rinaudo PF, Miller WL. 150 years of congenital adrenal hyperplasia: translation and commentary of De Crecchio's classic paper from 1865. *Endocrinology*. 2015 Apr 1;156(4):1210–7.
15. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2017 Oct 1;30(5):520–34
16. Ryckman KK, Cook DE, Berberich SL, Shchelochkov OA, Berends SK, Busch T, et al. Replication of clinical associations with 17-hydroxyprogesterone in preterm newborns. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2012 Jan 1;25(3–4).

17. Fardella B. C. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Revista chilena de pediatría*. 2001 Sep;72(5).
18. Samara-Boustani D, Bachelot A, Pinto G, Thibaud E, Touraine P, Polak M. Hiperplasia suprarrenal congénita: formas precoces. *EMC - Pediatría [Internet]*. 2010 Jan 1 [cited 2022 Jan 28];45(1):1–18.
19. Hora MR, Heather NL, Patel T, Bresnahan LG, Webster D, Hofman PL. Implementing steroid profiling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry improves newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand. *Clinical Endocrinology*. 2021 Jan 31;94(6):904–12.
20. Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, New MI. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia [Internet]. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editors. PubMed. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2020 Sep 9].
21. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *The Lancet*. 2005 Jun 18;365(9477):2125–36.
22. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatric Clinics of North America*. 2011 Oct; 58(5):1281–300.
23. White PC, Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocrine Reviews*. 2000 Jun [cited 2019 Dec 6];21(3):245–91.
24. Bachega T, White P. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21 Hydroxylase Deficiency: From Birth to Adulthood. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2012 Oct 8;30(05):400–9.

25. Hora M., Heather N., Webster D., Albert B., Hofman P. Birth Weight– or Gestational Age–adjusted Second– tier LCMSMS Cutoffd Improve Newborn Screening for CAH in Zealand. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021;106(9):3390–9.
26. 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; 90:584–95
27. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21–hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78:1145–52
28. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21–hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80:2322–9.
29. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21–hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet*. 1995; 96:198–204.
30. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21–Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018 Sep 27;103(11):4043–88.
31. Hora MR, Heather NL, Patel T, Bresnahan LG, Webster D, Hofman PL. Implementing steroid profiling by liquid chromatography–tandem mass spectrometry improves newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand. *Clinical Endocrinology*. 2021 Jan 31;94(6):904–12

32. Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007 Sep 21;8(4):349–63.
33. Moran C, Azziz R, Weintrob N, Witchel SF, Rohmer V, Dewailly D, et al. Reproductive Outcome of Women with 21-Hydroxylase-Deficient Nonclassic Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Sep 1;91(9):3451–6.
34. Escobar-Morreale HF, Sanchón R, San Millán JL. A Prospective Study of the Prevalence of Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia among Women Presenting with Hyperandrogenic Symptoms and Signs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008 Feb 1;93(2):527–33.
35. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2015 Jun 1;44(2):275–96.
36. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985 Feb 1 [cited 2021 Jan 10];82(4):1089–93.
37. Concolino P, Costella A. Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2018 Jun 1 [cited 2020 Feb 27];22(3):261–80.
38. Parsa AA, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017 Jan; 165:2–11.
39. Fontes N, Pereira M, Nascimento M, Oliveira E, Espada FV, Fonseca M. Hiperplasia congénita da suprarrenal por deficiência de 21-hidroxilase: correlação genótipo-

- fenótipo. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2012 Jul;7(2):8–12.
40. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Parente ÉB, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Mello MP, et al. Estudo multicêntrico de pacientes brasileiros com deficiência da 21-hidroxilase: correlação do genótipo com o fenótipo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2004 Oct;48(5):697–704.
41. Mendes C, Vaz Matos I, Ribeiro L, Oliveira MJ, Cardoso H, Borges T. Hiperplasia Congénita da Suprarrenal por Deficiência de 21-Hidroxilase: Correlação Genótipo-Fenótipo. *Acta Médica Portuguesa*. 2015 Feb 27;28(1):56.
42. Gama de Sousa S, Aguiar A, Foutoura M, Hiperplasia Suprarrenal Congénita: Revisão de 20 Casos da Consulta de Endocrinologia Pediátrica. *Acta Pediatr. Port.*, 2003; N° 4; Vol. 34: 259–263.
43. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting Phenotype in Steroid 21-Hydroxylase Deficiency? Comprehensive Genotyping in 155 Unrelated, Well-Defined Patients from Southern Germany. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 Mar 1;85(3):1059–65.
44. V Dolž, an, János Sólyom, Fekete G, József Gábor Kovács, V. Rakosnikova, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. 2005 Jul 1;153(1):99–106.
45. El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *The Lancet*. 2017 Nov;390(10108):2194–210.

46. New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *The American Journal of Medicine* [Internet]. 1995 Jan 16 [cited 2022 May 10];98(1): S2–8.
47. Wallac Oy. DELFIA® Neonatal 17 α -OH-progesterone kit. Instrução de utilização. Turku, Finland; 2019 Oct.
48. Berry JC, Betts PR, Wood PJ. The Interpretation of Bloodspot 17 α -Hydroxyprogesterone Levels in Term and Pre-Term Neonates. 1986 Sep 1;23(5):546–51.
49. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2014 Jul 1;51(Pt 4):424–40.
50. Shimozawa K, Saisho S, Yata JI, Kambegawa A. Age-Related Changes in Serum 17-Hydroxypregnenolone and 17-Hydroxypregnenolone Sulfate Concentrations in Human Infancy and Childhood. *Endocrinologia Japonica*. 1988;35(2):189–95.
51. Held PK, Bird IM, Heather NL. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: Review of Factors Affecting Screening Accuracy. *International Journal of Neonatal Screening* . 2020 Aug 23 [cited 2022 Oct 9];6(3):67.
52. 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. *Hormone Research in Paediatrics*. 2001;55(4):201–5.
53. Paolo Cavarzere, Camilot M, Teofoli F, Tatò L. Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in North-Eastern Italy: A Report Three Years into the Program. *Hormone Research*. 2005 Jan 1;63(4):180–6.

54. Nimkarn S, Lin-Su K, Berglind N, Wilson RC, New MI. Aldosterone-to-Renin Ratio as a Marker for Disease Severity in 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Jan 1;92(1):137–42.
55. Keely E, Malcolm J. Congenital adrenal hyperplasia in pregnancy: approach depends on who is the “patient.” *Obstetric Medicine*. 2012 Dec 1;5(4):154–60.
56. Nagamani M, McDonough PG, Ellegood JO, Mahesh VB. Maternal and amniotic fluid 17 α -hydroxyprogesterone levels during pregnancy: Diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in utero. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1978 Apr;130(7):791–4.
57. Taboada GF, Teixeira R de J, Corrêa FHS, Andrade Jr CRM, Dimetz T, Hohleuwerger R. Sensibilidade, especificidade e valor preditivo dos níveis basais da 17-hidroxiprogesterona no diagnóstico da forma não-clássica da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003 Oct;47(5):552–7.
58. Kurtoğlu S, Hatipoğlu N. Non-Classical Congenital Adrenal Hyperplasia in Childhood. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2017 Mar 7;9(1):1–7.
59. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9): 4133–4160.
60. Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, et al. Diagnóstico precoce: resultados preliminares do rastreio metabólico alargado. *Acta Pediátrica Portuguesa*. 2007;37(5):186–91.

61. Diário da República 2ª Série. Despacho nº 7276/2019. 2019 Aug [cited 2022 May 1]. Available from: <https://files.dre.pt/2s/2019/08/156000000/0014100147.pdf>
62. Petros M. Revisiting the Wilson–Jungner criteria: how can supplemental criteria guide public health in the era of genetic screening? *Genetics in Medicine*. 2011 Oct 7;14(1):129–34.
63. Wilson JM, Junger G. Principles and practice of screening for disease. *Public Health Papers*. Núm. 34. Geneva: World Health Organization; 1968.
64. Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Lopes L, Carvalho I, et al. Programa português de cribado neonatal. *Rev Esp Salud Pública*. 2020 Jan 26; 95: 1–7.
65. Vilarinho L, Garcia P, Pinho e Costa P. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce: relatório de 2021. 2021, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge: Porto, Portugal.
66. Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcão A, Fonseca H, Bogas M, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2010 Feb 23;33(S3):133–8.
67. Osório RV, Vilarinho L, Soares JP. Rastreio nacional da fenilcetonúria, hipotireoidismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Médica Portuguesa*. 1992 Mar 1;5(131-134).
68. Ifeanyi I. Momodu; Brian Lee; Gurdeep Singh. Congenital Adrenal Hyperplasia. PubMed. 2023 [cited 2023 May 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448098/>

69. Dulín Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. 2018 Jan;65(1):1–4.
70. Balsamo A, Baronio F, Ortolano R, Menabo S, Baldazzi L, Di Natale V, et al. Congenital Adrenal Hyperplasias Presenting in the Newborn and Young Infant. *Frontiers in Pediatrics*. 2020 Dec 22;8.
71. Claahsen – van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, Arlt W, Auchus RJ, Falhammar H, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia—Current Insights in Pathophysiology, Diagnostics, and Management. *Endocrine Reviews*. 2021 May 7;43(1).
72. Jayakrishna Tippabathani, Venu Seenappa, Alagupandian Murugan, Nagaraja Mahishi Phani, Hampe MH, Giridharan Appaswamy, et al. Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in Indian Newborns with Reflex Genetic Analysis of 21-Hydroxylase Deficiency. *International Journal of Newborn Screening*. 2023 Feb 21;9(1):9–9.
73. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective populationbased study. *JAMA Pediatr*. 2014;168(6):567–574.
74. Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, Derraik JGB, Jefferies C, Carll J, et al. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in New Zealand, 1994–2013. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015 Mar 1;100(3):1002–8.
75. Houang M, Thao Nguyen Khoa, Thibaut Eguether, Ribaut B, Brabant S, Polak M, et al. Analysis of a pitfall in congenital adrenal hyperplasia newborn screening: evidence of maternal use of corticoids detected on dried blood spot. *Endocrine Connections*. 2022 Jun 1;11(6).

76. 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(7):2581–9.
77. 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. *Clinical Chemistry*. 2004 Mar 1;50(3):621–5.
78. Kim, M. S., Tseng, T., Koppin, C. M. & Mitchell, E. Congenital Adrenal Hyperplasia in the Adolescent. *Handb. Gynecol*. 2016.
79. Rodríguez A, Ezquieta B, Labarta JI, Clemente M, Espino R, Rodriguez A, et al. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con formas clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa. *Anales de Pediatría*. 2017 Aug;87(2): 116.e1–10.
80. Javed A, Lteif AN, Kumar S. Update on treatment strategies for optimization of final adult height in children with congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012 Nov 1;10(1):164–73.
81. Ignacio J, Aizpún L, De Arriba Muñoz A, Ferrer Lozano M. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Protoc diagn ter pediatr*. 2019 [cited 2022 Nov 1]; 1:141–56. Available from: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/09_hiperplasia.pdf
82. Ishii T, Kenichi Kashimada, Amano N, Kei Takasawa, Akari Nakamura–Utsunomiya, Shuichi Yatsuga, et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency (2021 revision). 2022 Jan 1 [cited 2022 Dec 8];31(3):116–43.

83. Vogeser M, Parhofer K. Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) – Technique and Applications in Endocrinology. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2007 Oct 18;115(09):559–70.
84. Lahti A, Hyltoft Petersen P, Boyd JC, Fraser CG, Jørgensen N. Objective Criteria for Partitioning Gaussian-distributed Reference Values into Subgroups. *Clinical Chemistry*. 2002 Feb 1;48(2):338–52.
85. Consensus Statement on 21-Hydroxylase Deficiency from The European Society for Paediatric Endocrinology and The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Hormone Research in Paediatrics*. 2002;58(4):188–95.
86. Berry JC, Betts PR, Wood PJ. The Interpretation of Bloodspot 17α -Hydroxyprogesterone Levels in Term and Pre-Term Neonates. 1986 Sep 1;23(5):546–51.
87. Ng PC, Wong GW, Lam CW, Lee CH, Wong MY, Fok TF, Wong W, Chan DC: Pituitary adrenal response in preterm very low birth weight infants after treatment with antenatal corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3548–3552.
88. Olgemoller, B., Roscher, A. A., 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, 5790–5794.
89. Grunheiro-Papendieck L, Chiesa A, Mendez V, Prieto L. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: experience and results in Argentina. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008 21, 73–78.
90. Pombo. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*, McGraw Hill Interamericana, 3ª Edição.

91. Sarafoglou K, Banks K, Gaviglio A, Hietala A, McCann M, Thomas W. Comparison of One-Tier and Two-Tier Newborn Screening Metrics for Congenital Adrenal Hyperplasia. *PEDIATRICS*. 2012 Oct 15;130(5): e1261–8.

Apêndices

Apêndice 1. Concentrações dos pontos da curva de calibração, fornecidas pelo laboratório parceiro

Calibradores	Sobrecarga (nM)
Calibrador 1	0 (0)
Calibrador 2	5(10)
Calibrador 3	25(50)
Calibrador 4	50(100)
Calibrador 5	150(300)
Calibrador 6	300(600)
Calibrador 7	600(1200)
Calibrador 8	2000(4000)

Apêndice 2. Exemplo de resultados obtidos de uma curva de calibração do cortisol, a partir dos calibradores fornecidos pelo laboratório parceiro.

Cortisol (CpS)	d8-17OHP (CpS)	Cortisol/d8-17OHP	Concentração (nmol/L)
161	2875	0,06	0
165	2582	0,06	10
205	2557	0,08	50
286	2571	0,11	100
380	2457	0,15	300
605	2445	0,25	600
1058	2635	0,40	1200
3319	2655	1,25	4000

Apêndice 3. Resultados obtidos para a obtenção da curva de calibração do cortisol – CDC.

Cortisol (CpS)	D ₈ -17OHP (CpS)	Cortisol/d8-17OHP	Concentração (nmol/L)
282	130000	0,002	2,74
905	130000	0,007	17,26
2820	129000	0,022	62,19
4430	123000	0,036	132,15
23800	120000	0,198	680,27

Apêndice 4. Resultados obtidos para a obtenção da curva de calibração de 17-OHP – CDC.

17-OHP (CpS)	d8-17OHP (CpS)	17-OHP/d8-17OHP	Concentração (nmol/L)
649	130000	0,00	3,01
8750	129000	0,07	56,03
13500	123000	0,11	110,41
79200	120000	0,66	536,71

Apêndice 5. Resultados obtidos para a obtenção da curva de calibração de A4 – CDC.

A4 (CpS)	d8-17OHP (CpS)	A4/d8-17OHP	Concentração (nmol/L)
548	130000	0,00	3,29
5450	130000	0,04	19,73
23800	129000	0,18	78,36
38300	123000	0,31	142,05
196000	120000	1,63	659,86

Apêndice 6. Resultados obtidos para a obtenção da curva de calibração do 21-D – CDC.

21-D	d8-170HP	21-D/d8-170HP	Concentração (nmol/L)
114	130000	0,00	1,37
992	130000	0,01	15,34
3370	129000	0,03	63,70
6170	123000	0,05	131,64
29800	120000	0,25	683,42

Apêndice 7. Resultados obtidos para a obtenção da curva de calibração do 11-D – CDC.

11-D	d8-170HP	11-D /d8-170HP	Concentração (nmol/L)
583	130000	0,00	2,33
2470	130000	0,02	19,86
12400	129000	0,10	77,81
17000	123000	0,14	149,18
89700	120000	0,75	721,64