

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAROLINE MAGNABOSCO**

**O *Screening* Neonatal Expandido para Erros Inatos do Metabolismo:
Do Surgimento aos Dias Atuais**

**NOVEMBRO/2015
CURITIBA/PR**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAROLINE MAGNABOSCO

**O *Screening* Neonatal Expandido para Erros Inatos do Metabolismo:
Do Surgimento aos Dias Atuais**

Monografia de conclusão do Programa de Especialização Médica em Neurologia Pediátrica apresentada ao Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná para obtenção do título de especialista em Neurologia Pediátrica.
Orientador: Prof. Sérgio Antônio Antoniuk

NOVEMBRO/2015
CURITIBA/PR

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAIS E MÉTODOS	8
ASPECTOS HISTÓRICOS	8
O <i>Screening</i> Neonatal na América do Norte e Europa	8
O <i>Screening</i> Neonatal na América Latina	10
O <i>Screening</i> Neonatal no Brasil	11
A EXPANSÃO DOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL	12
O USO DA MS/MS NO <i>SCREENING</i> NEONATAL PARA AS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSOMAS	18
IMPLICAÇÕES DA TRIAGEM NEONATAL E OS EFEITOS DE UM TESTE FALSO POSITIVO	19
NOVOS DIRECIONAMENTOS DO <i>SCREENING</i> NEONATAL E A ERA DA GENÔMICA	20
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

As doenças chamadas Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são individualmente raras, no entanto coletivamente numerosas^{1,3}, com uma incidência estimada de 1:800 nascidos vivos nos EUA^{2,3}. Estão presentes em todos os grupos étnicos e distribuídas em todas as idades. São decorrentes de defeitos genéticos que resultam em anormalidades na síntese e catabolismo de proteínas, carboidratos, gorduras ou moléculas complexas^{1,2,3}. Apresentam uma gama grande de sintomas que se distribuem por todos os órgãos e sistemas, com início na vida neonatal ou adulta. Estas crianças podem apresentar retardo de crescimento intrauterino ou, após o nascimento, falha no crescimento e ganho de peso, sintomas neurológicos, sintomas psiquiátricos, alterações gastrointestinais, distúrbios cardíacos, alterações ósseas, miopatia, alterações endocrinológicas e alterações do balanço hidroeletrólítico entre outras^{1,3}. Existem tratamentos disponíveis com eficácia comprovada, como dieta e terapia de reposição enzimática, no entanto, muitas outras terapias estão sendo estudadas como futuras opções⁴. O objetivo de um programa de triagem neonatal é a detecção de doenças graves em recém-nascidos no estado pré-sintomático para a instituição do tratamento adequado o mais rápido possível, minimizando assim, a possibilidade de retardo mental e sequelas graves^{1,5,6,7}. A aplicação da espectrometria de massa em tandem (MS/MS) ao screening neonatal e ao diagnóstico pré-natal possibilitou o diagnóstico de muitas destas doenças no estado pré-sintomático^{1,3}. Como são doenças muito numerosas e com sintomas que inicialmente podem aparentar ser inespecíficos, a triagem neonatal assume um papel de suma importância na identificação destes casos^{2,3}. Este trabalho teve como propósito realizar uma revisão histórica dos programas de *screening* neonatal no mundo ressaltando a importância da expansão dos programas para um número maior de doenças passíveis de tratamento, assim como as preocupações inerentes a um programa de triagem neonatal e as futuras direções a que podem ser levados estes programas.

Palavras - chaves (key words): erros inatos do metabolismo, *screening* neonatal, expansão da triagem neonatal.

The Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism from the past to the present

ABSTRACT

The disorders called Inborn errors of metabolism are individually rare, however collectively common, with estimate incidence of 1:800 live births in the U.S.A.. They are included in every ethnic groups and all ages. These disorders come from genetic deficiency that result in abnormalities in the synthesis and catabolism of proteins, carbohydrates, fat or complex molecules. They present a great variety of symptoms that are distributed among every organs and systems, beginning in neonatal or advanced age. These children can show intrauterine growth retardation or, after birth, failure to thrive, neurological and psychiatric symptoms, gastrointestinal disturbances, heart disorders, bone problems, myopathy, endocrine dysfunction, metabolic derangements among other. There are available treatment with recognized efficacy, such as diet and enzyme replacement therapy, although, many other therapies have been studying as future options. The main aim of newborn screening program is to detect serious diseases in newborn babies on their presymptomatic stage/ fase so that the adequate treatment can be started as soon possible, minimizing the possibilities of mental retardation and severe trauma. The use of tandem mass spectrometry (MS/MS) on newborn screening and the prenatal diagnosis made it possible the diagnosis of a large number of these disorders on their presymptomatic stage. As these diseases are large in numbers and with symptoms which on their early stages are non specific, the newborn screening has an extremely important rol to identify these illnesses. The main aim of this research is to make a hystoric review of newborn screening tests in different countries giving great emphasis on the importance to expand this test to reach a greater number of diseases which can be treated, as well as the concerns regarding the newborn screening test and further direction in which these tests could cover.

Key words: Inborn errors of metabolism, Newborn screening, Expanded newborn screening.

INTRODUÇÃO

As doenças chamadas Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são individualmente raras, no entanto coletivamente numerosas^{1,3}. Estão presentes em todos os grupos étnicos e distribuídas em todas as idades. Têm uma incidência estimada de 1:800 nascidos vivos nos Estados Unidos da América (EUA). Nos outros países, a incidência geral e frequência das doenças individualmente variam de acordo com a composição étnica da população e extensão dos programas de *screening* neonatal, no entanto, acredita-se ser similar à incidência dos EUA. Dentre recém-nascidos que desenvolvem sintomas de sepse sem fator de risco conhecido, pelo menos 20% podem apresentar EIM^{2,3}.

Defeitos em um único gene podem resultar em anormalidades na síntese ou no catabolismo de proteínas, carboidrato, gorduras ou moléculas complexas. A maioria é devida a um defeito em uma enzima ou proteína de transporte, que leva a bloqueio de uma via metabólica. Os efeitos são devido ao acúmulo de substratos tóxicos antes do bloqueio, intermediários de vias metabólicas alternativas, defeitos na produção de energia e da deficiência causada pela utilização de substratos além do bloqueio, ou uma combinação destes fatores. Fisiopatologicamente, as desordens metabólicas podem ser divididas em três grupos diagnósticos^{1,2,3}.

Grupo 1: desordens que levam à intoxicação – inclui doenças do metabolismo intermediário que levam a uma intoxicação aguda ou progressiva devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos proximal ao bloqueio metabólico. São os erros inatos do catabolismo de aminoácidos, maioria das acidúrias orgânicas, defeitos congênitos do ciclo da uréia, intolerâncias aos açúcares, intoxicações por metais, porfirias, erros inatos da síntese e catabolismo de neurotransmissores e da síntese de aminoácidos¹.

Grupo 2: desordens envolvendo o metabolismo energético – grupo de doenças cujos sintomas são devidos ao menos em parte à deficiência na produção ou utilização da energia no fígado, músculo, cérebro ou outros tecidos. Dividido em defeitos energéticos citoplasmáticos e mitocondriais. São as acidemias lácticas, desordens da cadeia respiratória mitocondrial, defeitos do metabolismo dos ácidos graxos e dos corpos cetônicos, desordens da glicólise, metabolismo do glicogênio e gliconeogênese, hiperinsulinismo, desordens do metabolismo da creatina e erros do ciclo da pentose-fosfato¹.

Grupo 3: desordens envolvendo moléculas complexas – este grupo acomete organelas celulares e inclui doenças da síntese ou catabolismo de moléculas complexas. Inclui as desordens de depósito lisossomal, desordens peroxissomais e desordens do transporte intracelular. Pertencem a este grupo a deficiência de alfa-1-antitripsina, desordens congênitas da glicosilação e erros inatos da síntese do colesterol¹.

A constelação de sintomas das doenças metabólicas é extensa, com apresentação ocorrendo desde o período neonatal até a vida adulta ou final da infância e acometendo múltiplos sistemas. Estas crianças podem apresentar retardo de crescimento intrauterino ou, após o nascimento, falha no crescimento e ganho de peso. Sintomas neurológicos como hipotonia, convulsões, distúrbios de movimento, atraso do desenvolvimento e acidentes vasculares encefálicos, entre outros, são comuns, assim como sintomas psiquiátricos (problemas comportamentais e autismo, por exemplo). Muitos apresentam alterações gastrointestinais, como vômitos recorrentes, diarreia, recusa alimentar, disfagia, icterícia. Distúrbios cardíacos

também estão presentes, geralmente na forma de cardiomiopatias e arritmias. Alterações ósseas, miopatia, mioglobulinúria recorrente, alterações endocrinológicas e alterações do balanço hidroeletrólítico também estão entre as muitas manifestações possíveis^{1,3}.

As terapias atuais para estas doenças estão direcionadas a amenizar os sintomas pela restrição de nutrientes para prevenir intoxicações, suplementação de outros nutrientes para evitar deficiências, estimulação de vias alternativas para disponibilizar precursores metabólicos ou reposição das enzimas disfuncionais através da infusão intravenosa de proteínas. Recentemente novas drogas têm surgido, com o objetivo de inibir reações enzimáticas. Outro avanço atual no tratamento é o desenvolvimento de chaperonas moleculares, pequenas moléculas que se ligam especificamente nas proteínas defeituosas, estabilizando sua conformação e prevenindo a degradação precoce, permitindo assim, uma sinalização celular adequada. Outra terapia que vem sendo extensamente estudada é a terapia celular, com o transplante de hepatócitos, assim como as terapias gênicas. Estas terapias, no entanto, estão sendo realizadas experimentalmente, enquanto as terapias com dieta e reposição enzimática e, em alguns casos, inibidores de reação enzimática, já estão sendo realizadas a nível populacional⁴.

O objetivo de um programa de triagem neonatal é a detecção de doenças graves em recém-nascidos no estado pré-sintomático para a instituição do tratamento adequado o mais rápido possível, minimizando assim, a possibilidade de retardo mental e sequelas graves^{1,5,6,7}.

A aplicação da espectrometria de massa em tandem (MS/MS) ao screening neonatal e ao diagnóstico pré-natal possibilitou o diagnóstico de muitas destas doenças no estado pré-sintomático. No entanto é fundamental ao profissional médico o conhecimento destas doenças para a execução de um diagnóstico rápido, evitando ou minimizando sequelas graves. O diagnóstico clínico dos EIM depende de alguns princípios que devem ser seguidos. No contexto clínico apropriado: considerar EIM em paralelo com outra condição mais comum; atentar se os sintomas persistirem e permanecerem sem explicação após tratamento e investigação inicial para distúrbios mais comuns; suspeitar que qualquer morte neonatal seja devida a um EIM, principalmente se a causa for por sepse; não definir um sintoma ou uma síndrome como a etiologia, pois a causa de base pode ser um EIM ainda não bem caracterizado; um EIM pode se apresentar em qualquer idade; a maioria dos erros metabólicos genéticos são hereditários e transmitidos de forma recessiva, a maioria dos casos individuais aparenta ser esporádica; inicialmente pesquisar erros inatos com tratamento, principalmente nos pacientes com doenças agudas^{1,3}.

Como são doenças muito numerosas e com sintomas que inicialmente podem aparentar ser inespecíficos, a triagem neonatal assume um papel de suma importância na identificação destes casos^{2,3}.

Este trabalho tem como propósito realizar uma revisão histórica dos programas de *screening* neonatal no mundo ressaltando a importância da expansão dos programas para um número maior de doenças passíveis de tratamento, assim como as preocupações inerentes a um programa de triagem neonatal e as futuras direções a que podem ser levados estes programas.

MATERIAS E MÉTODOS

A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados eletrônicos PubMed. Os títulos e resumos foram ordenados, seguido de leitura atenta dos artigos completos, quando relevante.

Critérios de elegibilidade. Foram incluídos todos os tipos de desenhos de estudo: ensaios clínicos randomizados (ou não), estudos observacionais, retrospectivos e prospectivos, revisões, metanálises, relatos de casos e artigos de opinião.

ASPECTOS HISTÓRICOS

O *Screening* Neonatal na América do Norte e Europa

Antes do desenvolvimento dos programas de triagem neonatal, centenas de crianças sofriam de retardo mental anualmente, secundário a fenilcetonúria ou outras condições. Em 1934, Dr. Asbjørn Følling descreveu duas crianças com retardo mental grave, aumento da excreção urinária do ácido fenilpirúvico e caracterizou a herança autossômica recessiva da fenilcetonúria. O tratamento com dieta livre de fenilalanina provou-se efetivo em 1954, demonstrando que o retardo mental poderia ser prevenido, desde que estes pacientes pudessem ser tratados na fase assintomática. O primeiro teste de triagem para fenilcetonúria era baseado na detecção das fenilcetonas urinárias e tinha uma sensibilidade muito baixa³. No final da década de 1950, nos Estados Unidos, o biólogo Robert Guthrie passou a dirigir seus estudos para a prevenção da doença mental e, com este objetivo, adaptou o método de inibição bacteriana em que vinha trabalhando para a realização de identificação de erros inatos do metabolismo. Através desta metodologia poder-se-ia detectar patologias que tardiamente culminavam com o retardo mental dos pacientes. Através da inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*, realizava análise da presença de níveis elevados do aminoácido fenilalanina em amostras de sangue de recém-nascidos coletadas em papel filtro, realizando o diagnóstico precoce de fenilcetonúria^{6,8}. O primeiro *screening* populacional verdadeiro e a primeira publicação científica do Dr. Guthrie ocorreram no início da década de 1960. Seu trabalho marcou o início do *screening* neonatal não apenas nos EUA, mas no mundo todo^{3,6,8}.

Durante os anos de 1960 muitas das pesquisas sobre o *screening* neonatal ficaram concentradas no laboratório do Dr. Guthrie e focadas em testes para EIMs, até que Robert Phillips desenvolveu uma máquina automatizada a qual podia realizar quatro processos de testagem em um mesmo momento, o que permitiu a expansão dos programas para muitos países. Nos anos de 1970 o interesse em expandir a triagem neonatal aumentou. Dussault desenvolveu uma técnica de triagem em amostras de sangue colhidas em papel filtro para o hipotireoidismo congênito baseado nos níveis de tiroxina (T4). Também na década de 1970, foram desenvolvidos procedimentos de triagem para hemoglobinopatias, dosagem de tireotropina (TSH), hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase e muitas outras condições^{5,6,8}.

Com a expansão dos programas, iniciaram as dificuldades em decidir quais doenças seriam incluídas em seus programas mandatórios e quais crianças seriam submetidas – se apenas um grupo específico com maior risco ou se todas as crianças nascidas vivas. A maioria dos estados adotou as recomendações de Wilson

& Jungner, concentrando seus esforços para as doenças tratáveis com prevalência relativamente alta na população^{3,7}.

Em 1975 a Academia Nacional de Ciência recomendou que um único laboratório – como o Centro para Controle de Doenças (CDC) – deveria ser responsável por assegurar a qualidade dos programas de *screening*. Em 1977 o CDC criou um programa de qualificação nacional que continua até hoje⁸.

No final dos anos de 1980 e início de 1990 houve a introdução do DNA/RNA e MS/MS nos laboratórios de triagem neonatal. As técnicas de RNA e DNA foram usadas como teste de segundo nível para anemia falciforme e DNA para fibrose cística. O uso da MS/MS melhorou a eficiência do *screening* para as desordens dos aminoácidos, ácidos orgânicos e oxidação de ácidos graxos. Em alguns programas, a expansão dos programas de triagem também incluiu doenças infecciosas, como HIV e toxoplasmose, na década de 1990^{3,8}.

No Canadá, assim como nos EUA, o *screening* neonatal se iniciou em 1963, se expandindo para as outras províncias no decorrer da década de 1960. O investimento federal inicial era limitado a financiar estudos pilotos. Todos os *screenings* eram voluntários, o que continua até os dias atuais⁸.

Na América do Norte, todos os recém-nascidos têm acesso a alguma forma de *screening* neonatal, mas não de maneira uniforme em todos os países e nem em todos os estados americanos. Nos EUA todos os estados possuem uma lei que obrigam ou permitem a triagem como uma responsabilidade de saúde pública^{5,8}. No Canadá apenas uma província possui uma lei que obriga a triagem para duas desordens; as outras províncias dependem de boa prática médica para indicar uma triagem neonatal adequada. Em ambos os países, a política de suporte e financiamento varia em cada estado/província⁸.

O tempo para a coleta também varia de um estado para outro. Nos EUA, como as altas hospitalares dos recém-nascidos ocorrem cedo, a maioria dos programas recomenda a coleta das amostras com 24 a 48 horas de vida^{5,8}.

O número de doenças testadas nos EUA varia de estado para estado (de 29 a 59)⁹, sendo que apenas a fenilcetonúria, o hipotireoidismo congênito, a galactosemia e a anemia falciforme são universalmente realizados no país⁸. No Canadá o número de doenças varia de 5 a 38, sendo que apenas fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito de forma universal. Em 2006, no Canadá, 61% dos recém-nascidos eram triados para seis ou menos condições⁸.

Na Europa a situação é menos uniforme em relação à adoção do *screening* neonatal expandido quando comparado com os EUA. Portugal foi o primeiro país a adotar o *screening* para fenilcetonúria em 1979³. A Alemanha iniciou seu programa expandido em 2000, a Holanda em 2007 e a Grã Bretanha completou um estudo piloto em 2006, mas um programa nacional não foi iniciado até 2009¹⁰.

As desordens escolhidas para serem incluídas no *screening* neonatal diferem consideravelmente de um país para outro. Como toda a população europeia tem um *background* genético comum, a razão para estas diferenças não pode ser explicada por uma diferença maior nas prevalências destas doenças, mas sim por uma estimativa diferente dos riscos e benefícios¹⁰.

No Reino Unido, um dos argumentos contra o *screening* neonatal expandido é que as crianças portadoras das acidúrias mais comuns (propiónica e metilmalônica) não teriam benefício direto com o exame, pois os sintomas apareceriam antes de a amostra ser coletada ou o resultado estar disponível. No Reino Unido a recomendação da coleta da amostra é no quinto dia de vida, enquanto nos EUA e Alemanha é no segundo, com o resultado estando disponível entre o terceiro e quinto dia de vida, ainda sendo possível uma intervenção precoce para estas doenças. Isto não evita as consequências em longo prazo¹⁰.

O *Screening* Neonatal na América Latina

A América Latina é constituída de 20 países muito diversos entre si em extensão, densidade demográfica, taxas de nascimento, produto interno bruto, gastos com saúde pública, etc, tendo a língua como principal característica compartilhada por todos, exceto pelo Brasil e Haiti. Há também a presença de comunidades de imigrantes, constituindo importantes grupos étnicos¹¹.

Os projetos de triagem neonatal na América Latina se iniciaram em 1973 no México, quando Antonio Velázquez, após um treinamento com Robert Guthrie, iniciou um projeto para detecção de fenilcetonúria e outras aminoacidopatias. Contemporaneamente, no Brasil, Benjamin Schmidt e sua equipe iniciaram “Plano nacional para estudo e detecção de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) que podem levar a deficiência mental”. Em 1976 este projeto se tornou o primeiro programa de triagem neonatal da América Latina¹¹.

Muitos anos se passaram e a tarefa de integração completa dos programas de triagem neonatal com os sistemas nacionais de saúde ainda não está cumprida, visto que em alguns países o *screening* neonatal se iniciou apenas na última década¹¹.

Os principais motivos pelos quais os países latino-americanos apresentaram dificuldades para desenvolver seus programas de triagem neonatal são¹¹:

- Falta de recursos econômicos ou fundos destinados à implementação e funcionamento de tais programas.
- Presença de outros problemas de saúde pública, considerados prioridades, como desnutrição, parasitoses, doenças infecciosas e tropicais.
- Falta de conhecimento dos gestores de saúde sobre a importância e benefício dos programas de triagem neonatal.
- Atraso considerável na execução *screening* neonatal em comparação com os EUA ou Europa, uma vez que as primeiras experiências na América Latina começaram 15 ou 20 anos mais tarde e sob um esquema de testes em recém-nascidos sendo feito a pedido.
- Dificuldades na integração dos programas de triagem neonatal com os sistemas de saúde pública, e sua implementação como um programa de trabalho contínuo e sistemático, levando a implementação de políticas nacionais ou regionais organizadas quase 30 anos após os países desenvolvidos.
- Restrições econômicas, afetando a possibilidade de expansão dos programas para doenças detectadas por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) a partir do final de 1990¹¹.

Dentre as doenças triadas nos países com programas implementados e consolidados há muitos anos, existem diferenças gritantes. Por exemplo, no Uruguai

apenas a pesquisa para o hipotireoidismo congênito é mandatória, enquanto na Costa Rica um painel de 24 doenças é realizado em todos os nascidos vivos. De forma geral, a doença com maior cobertura na América Latina é o hipotireoidismo congênito, presente em todos os programas existentes. Para a fenilcetonúria, há triagem apenas na Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Paraguai e Venezuela. Outras doenças também são triadas em alguns países, como fibrose cística, galactosemia, hiperplasia adrenal congênita, deficiência de biotinidase, doença da urina do xarope do bordo, hemoglobinopatias e deficiência de G6PD. Aminoacidopatias, acidúrias orgânicas e defeitos na oxidação de ácidos graxos, detectados apenas por MS/MS, são oferecidos como *screening* populacional apenas na Costa Rica e, em quantidades muito menores, nos outros países pelo setor privado ou por solicitação médica¹¹.

Do ponto de vista de cobertura populacional, se estima que 49,3% de todos os recém-nascidos latino-americanos sejam atualmente triados para pelo menos o hipotireoidismo congênito¹¹.

O Screening Neonatal no Brasil

Desde a década de 1960, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a importância da realização dos programas populacionais de Triagem Neonatal, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o primeiro programa de triagem neonatal foi iniciado em 1976, na cidade de São Paulo, em uma Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SP), numa iniciativa pioneira na América Latina. Inicialmente realizava-se somente o diagnóstico de fenilcetonúria, porém a partir de 1980 incorporou-se a detecção precoce do hipotireoidismo congênito⁷.

Na década de 1980, foram aprovadas as primeiras leis para realização dos programas de triagem neonatal em poucos estados brasileiros como São Paulo (Lei Estadual n.º 3.914/1983) e Paraná (Lei Estadual n.º 867/1987), porém com a Lei Federal n.º 8.069, de 13 de julho de 1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente) houve a tentativa inicial de formalização da obrigatoriedade dos testes em todo o território nacional. “Os hospitais e demais estabelecimentos de atenção à saúde de gestantes públicos e particulares são obrigados a proceder a exames visando o diagnóstico e terapêutica de anormalidades no metabolismo do recém-nascido, bem como prestar orientações aos pais.” Em 1992, a legislação federal foi complementada, definindo fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito como as patologias a serem triadas (Portaria GM/MS n.º 22, de 15 de janeiro de 1992)⁷.

Apesar da legislação, ainda há falta de uniformidade na cobertura e implantação da triagem neonatal nos diversos estados brasileiros, tendo como consequência uma baixa cobertura no total de recém-nascidos triados⁷.

Em junho de 2001 o Ministério da Saúde (MS) inicia o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN – Portaria GM/MS n.º 822), com o objetivo de ampliar a triagem neonatal existente (fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito), incluindo a detecção precoce de outras doenças congênitas como a anemia falciforme, outras hemoglobinopatias e a fibrose cística, e ampliar a discussão, envolvendo desde a detecção precoce, a ampliação da cobertura populacional tendo como meta 100% dos nascidos vivos, a busca ativa de pacientes suspeitos de serem portadores das patologias, a confirmação diagnóstica, o acompanhamento, o adequado tratamento dos pacientes identificados e ainda a criação de um sistema de informações que permitirá cadastrar todos os pacientes num Banco de Dados Nacional⁷.

No Paraná, a triagem neonatal é realizada pela Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) desde 1987, sendo o primeiro serviço de referência em triagem neonatal brasileiro credenciado pelo MS para a pesquisa das quatro doenças do PNTN, no ano de 2001. A FEPE possui um laboratório equipado com o sistema de espectrometria de massa em tandem e metodologia validada capaz de realizar triagem para mais de 30 doenças metabólicas hereditárias. Hoje o centro de pesquisas realiza o teste do pezinho para aproximadamente 15400 recém-nascidos por mês, em parceria com Sistema Único de Saúde (SUS) e realiza *screening* para hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, deficiência de biotinidase, anemia falciforme, outras hemoglobinopatias, fibrose cística e hiperplasia adrenal congênita. O programa abrange todos os 399 municípios do Paraná, com 406 hospitais/maternidades e 1286 unidades básicas de saúde cadastradas. Os bebês que apresentam resultado positivo para as doenças são atendidos em ambulatório próprio e em parceria com o Hospital de Clínicas da UFPR e HEMEPAR/Curitiba¹².

A EXPANSÃO DOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL

O trabalho de Robert Guthrie nos anos de 1960 levou à fundação do *screening* neonatal como conhecemos hoje. Embora sua técnica de inibição bacteriana tenha sido substituída, sangue em papel filtro continua sendo a amostra de preferência nas triagens populacionais¹⁰. O uso da MS/MS para *screening* neonatal pode ser considerado um dos principais avanços na detecção de doenças metabólicas desde os ensaios para a fenilcetonúria. Com esta tecnologia, há a possibilidade de testar mais de 30 desordens metabólicas em uma única análise de uma amostra de sangue seco¹³. Surgiu então o paradigma “um teste, muitas doenças”, o que auxiliou na expansão dos programas de triagem neonatal³.

O objetivo de um programa de triagem neonatal é detectar doenças em estados pré-sintomáticos em recém-nascidos e oferecer tratamento que possa melhorar significativamente a qualidade de vida e modificar a história natural da doença. Os benefícios de uma detecção precoce devem superar sua carga. Além disso, os desfechos para o paciente que recebe a intervenção precoce devem ser positivos quando comparados com o daqueles pacientes tratados mais tardiamente¹⁴.

Em 1968 a OMS descreveu os princípios que deveriam ser adotados pelos programas de triagem neonatal. Critérios de Wilson & Jungner, 1968^{14,15}:

- A condição deve ser incluída como um problema de saúde importante;
- Deve existir um tratamento para os pacientes com a doença reconhecida;
- Devem existir locais de referência para diagnóstico e tratamento;
- Deve haver um estágio sintomático ou latente precoce reconhecível;
- Deve haver um teste ou exame adequado;
- O teste deve ser aceitável pela população;
- A história natural da doença, incluindo a evolução do estado latente para doença declarada, deve ser adequadamente compreendida;
- Deve haver uma política de acordado sobre quem irá tratar os pacientes;
- O custo da detecção de casos (incluindo diagnóstico e tratamento de pacientes diagnosticados) deve ser economicamente equilibrado em relação a possíveis despesas médicas como um todo;
- Detecção de casos deve ser um processo contínuo e não um projeto "de uma única vez"^{14,15}.

Estes critérios se tornaram de fato os adotados para a introdução de programas subsequentes, no entanto, avanços técnicos têm permitido a detecção precoce e tratamento adequado para diversas doenças metabólicas. Portanto, uma revisão dos critérios de Wilson & Jungner foi proposta em 2008 por Andermann et al¹⁴:

- O programa de *screening* deve responder a uma necessidade reconhecida;
- Os objetivos da triagem devem ser definidos no início;
- Deve existir uma população alvo definida;
- Deve haver evidências científicas da eficácia do programa de triagem;
- Deve ocorrer integração entre educação, testes, serviços clínicos e de gestão do programa;
- Deve haver garantia de qualidade, com mecanismos para minimizar os riscos potenciais do *screening*;
- O programa deve assegurar consentimento informado, confidencialidade e respeito pela autonomia;
- O programa deve promover a equidade e o acesso à triagem para toda a população-alvo;
- A avaliação do programa deve ser planejada desde o início;
- Os benefícios gerais da triagem devem compensar os danos¹⁴.

Antes de 1980, o diagnóstico de erros inatos do metabolismo dos ácidos orgânicos ou ácidos graxos era realizado pela cromatografia gasosa (GC), através da análise de marcadores urinários pouco específicos. A associação da espectrometria de massa (MS) às aplicações da GC no fim dos anos de 1970 possibilitou uma avaliação espectral de cada componente dentre os ácidos orgânicos. Esta técnica combinada, conhecida como GC/MS, tornou-se o padrão ouro no diagnóstico de doenças metabólicas através de amostras urinárias¹⁴.

Na metade dos anos de 1980 estavam sendo realizadas pesquisas no sentido de compreender o metabolismo da carnitina e acilcarnitinas e sua relação com o metabolismo dos ácidos graxos. Neste momento, a investigação era realizada por medidas plasmáticas e urinárias ou ensaios enzimáticos, radioenzimáticos e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção de carnitina, acilcarnitinas ou carnitina total. Os objetivos dos estudos era determinar o papel da carnitina e seus ésteres de ácidos graxos nas doenças metabólicas, sendo importante o desenvolvimento de novos métodos de detecção, o que levou ao desenvolvimento da MS/MS¹³. O perfil de acilcarnitinas por MS/MS foi primeiramente realizado por David Millington e colaboradores no início da década de 1990, em seguida foi adaptado para a análise de aminoácidos em 1993 por Chace e colaboradores^{3,10}.

O espectrômetro de massa é essencialmente um detector que identifica a massa de moléculas individuais e de seus fragmentos, fornecendo um gráfico conhecido como espectro de massa^{3,13}. No início, esta técnica não foi adotada pelos sistemas e saúde devido ao alto custo do instrumento (aproximadamente U\$400 000,00). Em contraste, o custo dos reagentes e acessórios do espectrômetro é extraordinariamente baixo. Importante também ressaltar a capacidade do instrumento de analisar rapidamente ao mesmo tempo diferentes famílias químicas, o que o torna efetivo em termos econômicos¹³.

A amostra de sangue em papel filtro apresenta algumas desvantagens. A quantidade de sangue presente no papel varia de acordo com o hematócrito, o diâmetro da mancha de sangue, o grau de saturação, o grau de hemólise, e outros

fatores menores relacionados com a coleta do sangue e do controle rígido do papel de fibra de algodão e do meio ambiente quando se aplica o sangue (umidade e temperatura)^{3,6,13}. Devido a estes fatores numerosos, uma mancha de sangue seco é uma amostra altamente imprecisa em comparação com líquidos como urina, sangue e plasma^{3,6,13}. No entanto, a MS/MS em papel filtro não pode ser subestimada, pois existem abordagens e métodos que reduzem a imprecisão analítica, mantendo a precisão diagnóstica. No início dos anos de 1990 os resultados eram interpretados primeiramente por exame visual do espectro, semelhante à forma como a interpretação dos ácidos orgânicos é realizada ainda hoje. Com a melhoria nos *softwares*, houve o desenvolvimento automatizado de cálculos quantitativos dos dados, no entanto ainda não substitui a experiência necessária para reconhecer perfis complexos¹³.

O sucesso do *screening* depende fortemente da qualidade da amostra analisada. Consequentemente, uma amostra coletada inadequadamente pode interferir em todo o processo da triagem. A qualidade depende do tempo de coleta adequado, aplicação correta do sangue no papel filtro, secagem suficiente antes de armazenamento e tempo de transporte até o laboratório. Um erro em qualquer dos passos acima pode resultar em amostra insuficiente para a análise. O tempo adequado evita resultados dúbios afetados pela idade, a aplicação correta do sangue evita análise com pouca acurácia resultante de alterações na saturação e a secagem suficiente e tempo de transporte curto evitam a degradação da amostra^{3,13}.

Para que ocorra aproveitamento máximo da tecnologia da MS/MS na detecção de níveis anormais de metabólitos entre neonatos, muitos dos quais já estão presentes na primeira semana de vida, um transporte rápido dos espécimes para o laboratório é fundamental. A recomendação para o tempo de diagnóstico é de até cinco dias após o nascimento. Se o teste vier positivo, recomenda-se o novo teste e teste confirmatório em menos de 24 horas¹³.

Aproximadamente quatro milhões de bebês são submetidos à triagem por amostra de sangue seco nos EUA, com o objetivo de detectar doenças metabólicas, hemoglobinopatias e endocrinopatias. Estas doenças correspondem a aproximadamente 6000 casos de doenças debilitantes ou potencialmente fatais por ano e que podem ter um prognóstico mais favorável se diagnosticadas precocemente^{3,13}.

A análise para múltiplas desordens em um mesmo momento necessita que sejam escolhidos que tipos de doenças devem ser analisados e também quais metabólitos serão usados para caracterizar tais doenças, visto que um mesmo metabólito pode estar alterado em mais de uma desordem ou uma única desordem pode apresentar mais de um metabólito alterado¹⁶.

Existem estudos indicando que um painel de *screening* de acilcarnitinas e aminoácidos apresentem um resultado positivo para cada 4000 a 5000 exames, sendo importante ressaltar que, para determinadas doenças, o diagnóstico precoce resultará em ganhos substanciais na qualidade de vida. Por exemplo, a deficiência da Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) tem uma morbidade importante e mortalidade de 20 a 25% entre os primeiros três anos de vida, no entanto, se diagnosticada antes do início dos sintomas, pode-se prevenir a morte e melhorar a qualidade de vida, apesar de não existir tratamento específico para a doença¹⁶.

As desordens do metabolismo dos aminoácidos e de oxidação dos ácidos graxos foram reconhecidas como causas de morbidade e mortalidade entre crianças nos anos de 1930 e 1970 respectivamente. Assim que foram reconhecidas como doenças metabólicas, iniciaram as pesquisas para desenvolvimento de métodos de detecção. Nos anos de 1960, foi iniciada a triagem populacional para aminoacidopatias e, nos meados de 1980, foi demonstrado o valor terapêutico da medida dos ácidos graxos a partir das acilcarnitinas¹⁶.

No início dos anos de 1990 ocorreram avanços na análise automatizada da MS/MS pela introdução da ionização por *spray* de elétrons, validação de métodos de introdução de amostras e desenvolvimento de sistemas de interpretação automatizados. Atualmente, o desenvolvimento de novas técnicas possibilita um aumento exponencial na capacidade de análise diária de cada máquina. Em 1990 eram analisadas 5-10 amostras por dia nos testes técnicos. Em 1993, 60 a 120 amostras por dia eram rodadas nos estudos piloto e a partir dos anos 2000 se estimou que cerca de 500 000 amostras podem ser analisadas por dia¹⁶.

A MS/MS tem sido aplicada para detectar mais de 60 doenças metabólicas diferentes definidas, possibilitando o tratamento precoce. A sensibilidade da técnica é de 99% e especificidade de 99,995% para a maioria das acidemias orgânicas, desordens dos aminoácidos e desordens da oxidação dos ácidos graxos¹⁷. Em um estudo piloto realizado na Califórnia a MS/MS apresentou uma taxa de detecção de uma desordem detectada para cada 4463 recém-nascidos triados¹⁸. Um estudo recente de Singapura encontrou um resultado verdadeiramente positivo para cada 3159 crianças no período de 2006 a 2013 em que o estudo foi realizado¹⁹.

Desordens metabólicas detectáveis em recém-nascidos de 1-5 dias por MS/MS (tabela 1)¹⁶:

Desordem	Indicador metabólico primário
Aminoácidos	
Fenilcetonúria	Fenilalanina
Doença da urina do xarope do bordo	Leucina/isoleucina, valina
Homocistinúria	Metionina
Hipermetioninemia	Metionina
Citrulinemia	Citrulina
Acidúria argininosuccínica	Citrulina
Tirosinemia tipo I	Tirosina
Ácidos graxos	
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média	C8, C10, C10:1, C6
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa	C14:1, C14, C16
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia curta	C4
Deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenase	C4, C5, C8:1, C8, C12, C14, C16, C5DC
Deficiência de carnitina palmitoil transferase	C16, C18:1, C18
Defeito na carnitina/acilcarnitina translocase	C16, C18:1, C18
Deficiência da hidroxil acil-CoA desidrogenase de cadeia longa	C16OH, C18:1OH, C18OH
Deficiência de proteína trifuncional	C16OH, C18:1OH,

	C18OH
Ácidos orgânicos	
Acidemia glutárica tipo I	C5DC
Acidemia propiônica	C3
Acidemia metilmalônica	C3
Acidemia isovalérica	C5
Deficiência de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liase	C5OH
Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase	C5OH

Desordens metabólicas detectáveis em recém-nascidos com mais de cinco dias por MS/MS (tabela 2)¹⁶:

Desordem	Indicador metabólico primário
Argininemia	Arginina
Hiperglicinemia não cetótica	Glicina
Tirosinemia tipo II	Tirosina
Síndrome de hiperamonemia, hiperornitinemia, homocitrulinemia	Ornitina, homocitrulina
5-oxoprulínúria	5-oxoprulina
Deficiência de carnitina palmitoil transferase tipo I	Carnitina livre
Deficiência de isobutiril-CoA desidrogenase	C4
Deficiência de acetoacetil-CoA tiolase mitocondrial	C5:1, C5OH
Acidúria malônica	C3-DC
Deficiência de 2-metilbutiril-CoA desidrogenase	C5

Um único metabólito alterado pode ser marcador de mais de uma doença metabólica, portanto, é necessária outra forma de confirmação diagnóstica, como genética molecular, estudos enzimáticos, estudos em fibroblastos¹³.

Tecnicamente a MS/MS é um método altamente eficaz. Um estudo realizado na Alemanha pesquisou aminoacidemias, desordens da oxidação dos ácidos graxos e acidúrias orgânicas pelo método da MS/MS e encontrou uma prevalência total de 1:2400 recém nascidos. A prevalência das aminoacidemias foi de 1:3800, das desordens da oxidação dos ácidos graxos foi de 1:10400 e das acidúrias orgânicas 1:14700. A taxa de falsos positivos foi de apenas 0,33%, gerando uma especificidade de 99,67%. A especificidade para aminoacidemias e doenças da oxidação dos ácidos graxos foi de 99,9% cada e para as acidúrias orgânicas foi de 99,87%. O valor preditivo positivo para o método foi de 11,31%, refletindo uma elevada especificidade diagnóstica. O maior valor preditivo positivo foi obtido para as aminoacidemias (20,12%), seguido pelas desordens da oxidação dos ácidos graxos (8,57%) e pelas acidúrias orgânicas (5,09%). A sensibilidade foi de 94,2% para as aminoacidemias, sendo que todos os pacientes não diagnosticados pelo método foram com hiperfenilalaninemia não fenilcetonúria leve, e 100% para as desordens da oxidação dos ácidos graxos e acidúrias orgânicas. Todos os pacientes com *screening* alterado foram submetidos a testes confirmatórios. Dentre os pacientes diagnosticados, 58% necessitaram de tratamento e permaneceram assintomáticos durante o follow-up, o que se pode afirmar que foram beneficiados com o *screening*.

A eficiência diagnóstica da MS/MS nesta coorte foi de 94%. A estimativa da frequência total de recém-nascidos beneficiados com o *screening* foi de 1:4100 recém-nascidos daquela população²⁰.

Um estudo em Singapura, usando MS/MS para triagem de 26 doenças apresentou dados satisfatórios. Uma sensibilidade de 95,59%, especificidade de 99,85%, valor preditivo positivo de 20% e taxa de falsos positivos de 0,15. Se restringido para 20 doenças principais, a sensibilidade do teste foi de 100%. Para aminoacidopatias apresentou uma especificidade de 99,99%, para doenças da oxidação dos ácidos graxos foi de 99,96% e para acidemias orgânicas 99,93%. O valor preditivo positivo foi maior para doenças da oxidação dos ácidos graxos (34%), seguido pelas acidemias orgânicas (18%) e pelas aminoacidopatias (10%). O valor preditivo positivo global foi de 30%¹⁹.

Os EIM são um grupo de doenças com diagnóstico difícil de ser realizado sem a existência de um programa de triagem neonatal associado que auxilie os profissionais de saúde nesta árdua tarefa. Frequentemente o diagnóstico é realizado tardiamente, quando já existem consequências irreversíveis para a vida e função cognitiva das crianças. No estudo da Califórnia foi verificado que, do número estimado de casos na população não triada, apenas 23% foi encaminhada para centros de referência para diagnóstico, confirmando novamente a necessidade de um *screening* populacional mandatório¹⁷. No estudo de Singapura, estimava-se que no período de 2006 a 2013, dentre os recém-nascidos não submetidos à triagem neonatal, haveria 44 casos de erros inatos do metabolismo, baseado na incidência total de 1:3265. Durante o período, apenas seis crianças receberam diagnóstico de doença metabólica e já apresentavam sequelas neurológicas irreversíveis¹⁹. Algumas doenças maternas com tratamento também podem ser detectadas durante a análise de amostras de sangue seco neonatal, incluindo deficiência primária de carnitina, homocistinúria, acidemia metilmalônica e deficiência de vitamina B12³.

Em termos de custos, o custo por procedimento por MS/MS foi estimado de US\$ 7,5 por teste, tendo sido descrito até US\$ 10,00³, o que, em um programa populacional, geraria um custo de US\$ 30750,00 para a detecção de um afetado. Os custos de tratamento para um paciente com estas doenças, se não diagnosticadas a tempo, é em torno de 0,5 a 1,5 milhões de dólares em toda a vida²⁰. Filiano et al. estimaram que o custo de um paciente com paralisia cerebral da infância até os 65 anos de vida seria de US\$167 000 a US\$1 000 000 em 1998, incluindo custos com hospitalizações, despesas escolares, terapias, etc. Os autores projetaram que poderia se conseguir uma economia anual de US\$36 600 000 através de um *screening* neonatal que contemplasse doenças neuro metabólicas graves³.

A MS/MS tem outras aplicações além de triagem neonatal. Na verdade, no início era usada como *screening* em pacientes de alto risco e mais tarde adaptada ao *screening* neonatal. Além disso, tem aplicação em outras áreas, como estudos farmacêuticos e ambientais e análises forenses, porém, com potencial para expansão para muitas outras áreas da saúde humana¹³.

Existem limitações e desvantagens com a expansão dos programas de triagem neonatal. Devido à implementação recente da expansão dos programas de triagem neonatal, somente no final dos anos de 1990, ainda há falta de avaliação sistematizada de tratamentos em longo prazo³. Alguns pacientes com doenças iniciadas nos primeiros dias de vida podem não se beneficiar com o *screening* expandido como, por exemplo, pacientes com acidemia metilmalônica que podem morrer nas primeiras 36 horas de vida na apresentação precoce da doença, o que

ocorreria antes da coleta do sangue em papel filtro, na maioria dos programas. Como há diferença no *screening* de um país para outro, há vezes em que análises não listados como mandatórios não são listados nos resultados, mesmo se estiverem com valores anormais. Condições benignas ou com significância patológica duvidosa podem ser identificadas e, nestes casos, o *screening* pode causar mais angústia do que ser benéfico³. Outro ponto importante a se considerar é o fato de que em alguns países apesar de a triagem expandida estar disponível ou até mesmo ser obrigatória, o tratamento não é oferecido da mesma forma a população que recebe o resultado positivo. Drogas e fórmulas especiais de alto custo são necessárias para algumas destas doenças³.

O USO DA MS/MS NO SCREENING NEONATAL PARA AS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISOSSOMAIS

Doenças de depósito lisossomal (LSD) são um grupo de cerca de 50 condições genéticas em que ocorre falha da função lisossomal^{6,14}. São progressivas, geralmente assintomáticas ao nascimento, mas com as características clínicas se tornando evidentes no início da infância, com algumas manifestações graves, alta morbidade e redução na expectativa de vida. São individualmente raras, mas em grupo apresentam uma prevalência em torno de 1:4000 a 1:9000 nascidos vivos. São na maioria condições tratáveis por diversas formas terapêuticas, como terapia de reposição enzimática, terapia de inibição do substrato, transplante de medula óssea, chaperonas e outras tecnologias em desenvolvimento^{6,14}. O principal fator de sucesso no tratamento é o início precoce, no entanto, falta de conhecimento ou falta de acesso aos testes causa um atraso significativo no diagnóstico. Este é o estímulo para incluir estas doenças nos programas de triagem neonatal¹⁴.

Devido aos avanços tecnológicos, métodos *multiplex* de alto rendimento atualmente estão disponíveis para testagem de muitas destas condições. A MS/MS também é utilizada para o diagnóstico destas doenças e tem se demonstrado a técnica mais promissora para diagnóstico neonatal^{6,14}. Seis LSD estão sendo triadas nos EUA com a técnica de MS/MS: doença de Gaucher, doença de Pompe, doença de Fabry, doença de Niemann-Pick, mucopolisacaridose tipo I e doença de Krabbe. Tem se demonstrado que as enzimas testadas para as LSDs permanecem ativas nas amostras de sangue seco em papel filtro⁵.

Em termos populacionais vários relatos apontam para alta incidência de algumas doenças em certas populações ou regiões na América Latina (Gaucher e doença de Tay-Sachs em judeus Ashkenazi, GM1-gangliosidosis em Malta e no Sul do Brasil, doença de Sandhoff na Argentina e muitos outros exemplos). Existem projetos pilotos para o *screening* para estas doenças na Europa, Estados Unidos e Japão. Na América Latina muitos países ainda não apresentam um programa de triagem neonatal bem estabelecido e provavelmente ainda levará anos para que isso ocorra. Apesar das deficiências no setor de saúde pública que torna difícil o rastreamento de base populacional, a maioria dos países latino-americanos já tem a capacidade de realizar a triagem de populações selecionadas¹⁴.

Em relação às LSDs, foi detectado uma comunidade com incidência aumentada de doença de Gaucher no Ceará e duas comunidades com maior incidência de MPS tipo VI na Bahia e em Minas Gerais. Na Colômbia há um significativo número de relatos de casos de MPS tipo IV e no Chile MPS tipo VI. A genética médica populacional pode auxiliar na identificação de regiões em que há uma prevalência maior de determinada doença e estabelecer um programa de triagem direcionado para necessidades específicas, como é o caso da população no

nordeste do Brasil, onde foi identificada uma maior prevalência de casos de MPS tipo VI e desenvolvido um projeto piloto. Este programa vai permitir não só a identificação precoce e tratamento de recém-nascidos afetados, mas também a detecção de portadores, e o que permitiria o aconselhamento genético¹⁴.

Nos EUA, o estado do Missouri exige *screening* para LSD, incluindo doença de Pompe, Fabry, Gaucher, Krabbe e MPS tipo I desde 2013. A triagem é realizada pelo método microfluídico digital (um tipo de MS/MS) em sangue de papel filtro. Uma análise dos dados do estudo piloto realizado no estado demonstrou que o valor preditivo positivo foi de 47% para Pompe, 10% para Gaucher, 58% para Fabry e 11% para MPS tipo I. As taxas de falsos positivos foram de 0,009% para Pompe, 0,02% para Gaucher, 0,025% para Fabry e 0,037% para MPS tipo I²⁰.

IMPLICAÇÕES DA TRIAGEM NEONATAL E OS EFEITOS DE UM TESTE FALSO POSITIVO

A expansão dos programas de triagem neonatal tem suscitado as mesmas preocupações dos primeiros programas nos anos 1960. Dentre os problemas incluem a tomada de decisão apressada, fragmentada e sem conhecimento, a falta de estudos controlados para avaliar as estratégias de tratamento e a resposta das famílias ao *screening*²¹.

O *screening* expandido gera preocupações inerentes a qualquer programa de triagem. Uma delas é o provável aumento de falsos-positivos e a ansiedade gerada na família. A segunda é uma interpretação equivocada de anormalidades bioquímicas leves e provavelmente benignas, levando a tratamento preventivo²⁰. Um resultado falso positivo é um resultado inicial fora dos padrões e que não resulta em doença nas avaliações adicionais. Geralmente não são erros laboratoriais e sim achados transitórios ou indicativos de um status de carreador. Quando necessário, é solicitada nova amostra após a saída do recém-nato da maternidade. A triagem neonatal por MS/MS apresenta uma taxa de 0,33% de falsos positivos, o que corresponde a aproximadamente um caso para cada 2400 crianças testadas²².

Estudos que compararam crianças diagnosticadas pela triagem neonatal com crianças diagnosticadas clinicamente demonstraram que as crianças diagnosticadas pelo *screening* neonatal iniciavam tratamento em média quatro meses antes das crianças do grupo identificado clinicamente e, quando necessitavam internamentos, permaneciam em média um dia a menos no hospital a cada admissão. No momento do diagnóstico há uma porcentagem significativamente menor de crianças apresentando sintomas naquelas diagnosticadas pelos programas de triagem e estas crianças apresentam menos complicações após o diagnóstico e início do tratamento²¹. Em relação ao desenvolvimento mental, crianças com diagnóstico pelo *screening* neonatal apresentavam uma pontuação maior nas escalas de Inteligência e desenvolvimento motor. Em crianças identificadas clinicamente, uma porcentagem maior se enquadra na categoria de deficiência mental. Foram notados déficits na comunicação, atividades de vida diária, socialização e habilidades motoras em quase metade das crianças identificadas clinicamente²¹.

A existência de um falso positivo é um fator gerador de estresse para as famílias. Estudos demonstram que há mais taxa de hospitalizações por causas pediátricas quando comparados com crianças com a triagem neonatal normal. Os pais de crianças que receberam um resultado falso positivo apresentam maiores níveis de estresse¹⁹. Os resultados deste estudo demonstraram que um resultado

falso positivo pode afetar a percepção dos pais sobre a saúde dos seus filhos, gerar estresse dos pais e afetar a relação pais-filhos²².

NOVOS DIRECIONAMENTOS DO SCREENING NEONATAL E A ERA DA GENÔMICA

O objetivo primário da expansão de um programa de *screening* neonatal é aumentar a sensibilidade, desenvolver marcadores específicos, minimizar o risco de resultados falsos positivos e aumentar o valor preditivo positivo dos resultados dos exames⁵. As aplicações potenciais da MS/MS possibilitaram os programas de triagem neonatal a cobrir um número potencialmente maior de doenças, incluindo desordens lisossomais, adrenoleucodistrofia ligada ao X, desordens congênitas da glicosilação, desordens da biossíntese de creatina e hiperplasia adrenal congênita. Novas tecnologias estão sendo utilizadas para aumentar a capacidade diagnóstica e reduzir os custos, como a cromatografia líquida e cromatografia líquida de alta resolução, que, quando associadas a MS/MS, melhoram o poder de discriminação de segundo nível³.

O advento das tecnologias moleculares tornou a abordagem genômica nos programas de triagem neonatal tecnicamente viável e atraente para desenvolvimento e pesquisas³.

Em 1997, Lo et al demonstrou a existência de DNA celular fetal livre (ccffDNA) circulante no sangue materno a partir da quinta semana de gestação na proporção de 10%. A acurácia diagnóstica é 100% a partir da décima sétima semana de gestação. O ccffDNA pode ser usado na prática clínica para o diagnóstico pré-natal não invasivo, como a determinação da tipagem Rh fetal, avaliação da trissomia do 21 e sexagem fetal e doenças ligadas ao X, como hemofilia. Como o ccffDNA corresponde a apenas 10% do DNA circulante no sangue materno, o diagnóstico pré-natal não invasivo está destinado à análise de doenças *de novo* ou heranças paternas, embora alguns trabalhos explorem a possibilidade de aplicabilidade para desordens com herança Mendeliana recessiva, como fibrose cística, α - e β -talassemia, acidemia propiônica, hiperplasia adrenal congênita e amaurose congênita de Leber. Com o desenvolvimento da tecnologia, acredita-se que futuramente será possível sequenciar todo o genoma do feto. Situação que esbarra em muitas barreiras éticas¹⁵.

As doenças genéticas congênitas representam uma carga desproporcionalmente grande para as famílias e os sistemas de saúde. Os defeitos de nascimento estruturais sozinhos têm se mantido uma consistente causa de mortalidade após um ano de vida. Nos EUA estas doenças representam 21% de todas as mortes infantis. O diagnóstico e manejo das doenças genéticas devem ser considerados em dois pontos. Primeiro, o *screening* de base populacional, que inclui os indivíduos assintomáticos. Segundo, análise direcionada para indivíduos com suspeita de doença genética^{23,24}.

Em relação ao *screening* de base populacional, muitos países estão adotando a triagem genética com vários propósitos, com o objetivo de detectar subconjuntos de doenças genéticas mais comuns de determinada população. Por exemplo, vários países fazem triagem genética mandatória para o status de carreador do gene da β -talassemia ou algumas comunidades judias ortodoxas possuem testagem mais extensiva para doenças catastróficas na infância, como Tay Sachs. A implementação destes testes leva a questionamentos éticos, como o qual seria o verdadeiro benefício do indivíduo e da população comparado com o risco de

perda de privacidade, estresse emocional e estigmatização. Nos países desenvolvidos a restrição dos testes genéticos a desordens que apresentam intervenções terapêuticas é o guia para o desenvolvimento do *screening* genético mais comum: triagem neonatal para doenças metabólicas. Enquanto há consenso que o *screening* neonatal é fundamental e salva vidas, há um extenso debate em quanto deve ser expandido. Por exemplo, em 2006 o estado de *New York* iniciou um programa de triagem para a doença de Krabbe, uma doença com prevalência de 1:100 000 nascidos vivos e de evolução catastrófica. No entanto, acredita-se que o diagnóstico neonatal não seja de todo benéfico, pois a determinação da atividade enzimática não é suficiente para avaliar o fenótipo e o único tratamento disponível, o transplante de células tronco hematopoiéticas (procedimento que sozinho apresenta uma mortalidade de 10%), tem possibilidade de alguma resposta apenas se realizado antes dos sintomas neurológicos^{23,24}.

Em relação à análise direcionada, ela pode ser oferecida tanto para os pré quanto para os pós-sintomáticos. O teste pré-sintomático é oferecido para indivíduos com uma carga genética e/ou fatores de risco, como os casos de história de uma doença genética na família. Os testes mais frequentemente oferecidos são os de pesquisa de susceptibilidade genética a um determinado tipo de câncer em adultos, mas também podem ser realizados testes pré-natais para aneuploidias em caso de idade materna avançada ou lesões específicas genéticas/genômicas conhecidas por estarem presentes em membros da família. O teste pós-sintomático é oferecido para indivíduos com suspeita clínica de doença genética, variando de um painel específico para determinado tipo de gene até o sequenciamento de todo o genoma, dependendo da complexidade da apresentação clínica^{23,24}.

Estudos piloto estão demonstrando a viabilidade de análises amplas do genoma em amostras de sangue seco em papel filtro e se espera que o sequenciamento completo de recém-nascidos ocorra em um futuro próximo. O uso de sequenciamento de nova geração possibilitará a detecção de um grande número de doenças genéticas sem aumento substancial nos custos dos programas de triagem neonatal⁶.

A questão é: quem deve ser sequenciado ao nascimento? O exoma ou o sequenciamento do genoma (*whole genome sequencing*) deve inicialmente ser indicado para crianças com anormalidades detectáveis ao nascimento, sendo, portanto, um exame solicitado em evidência de patologia e não uma triagem para crianças assintomáticas. Um exoma solicitado na evidência de uma doença genética tem uma taxa diagnóstica de apenas 25%, portanto, se solicitado para crianças sem suspeita tem pouco ou nenhum benefício. Aliás, pode inclusive resultar em dificuldade analítica, apontando mutações sem significado clínico conhecido^{23,24}.

CONCLUSÃO

Os programas de triagem neonatal expandidos possibilitam benefícios fundamentais para os pacientes portadores de uma doença metabólica, facilitando o diagnóstico precoce e tratamento pré-sintomático e prevenindo investigações extensivas e desnecessárias. Também tornam possível o planejamento familiar e aconselhamento genético.

Os programas de triagem neonatal expandidos já se provaram ser economicamente viáveis, com uma significativa redução nos gastos com o tratamento crônico das doenças, assim como das agudizações, no entanto, o mais

importante é que a melhora da qualidade de vida e redução do sofrimento, tanto dos pacientes quanto das famílias, não podem ser expressos por valores monetários.

É importante levar em consideração a relevância clínica e prevalências em uma determinada população ao escolher quais doenças serão incluídas em um programa de triagem, assim como levar em consideração a disponibilidade ou não de tratamentos para que ocorra melhora da qualidade de vida, controle dos sintomas ou até mesmo prevenção de desenvolvimento dos sintomas. Os países desenvolvidos, como EUA e Canadá apresentam programas de triagem neonatais mais consolidados e com número muito maior de doenças quando comparado com os países em desenvolvimento, que ainda necessitam evoluir décadas para alcançar o patamar e propiciar um programa verdadeiramente eficiente.

A MS/MS é um método comprovadamente eficaz, no entanto ainda é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que melhorem a eficácia diagnóstica a fim de minimizar o número de falsos positivos, pois um resultado falso positivo pode expor a família a níveis elevados de estresse, prejudicando a relação familiar. Além da aplicabilidade do método para a detecção de acidemias orgânicas, desordens dos aminoácidos e desordens da oxidação dos ácidos graxos, estudos estão sendo realizados para que ocorra a expansão dos programas ainda para a triagem das doenças de depósito lisossomais, o que aumentaria ainda mais o poder de detectar doenças no estado pré-sintomático.

Por fim, o desenvolvimento de tecnologias como sequenciamento de nova geração está levantando a possibilidade de *screening* neonatal ou até antenatal com diagnóstico molecular, no entanto, esta técnica ainda esbarra em muitas barreiras éticas e necessita de extensa discussão e comprovação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saudubray JM, van den Berghe G., Walter JH. Inborn Metabolic Diseases – Diagnosis and Treatment. 5th ed. Springer: Verlag Berlin Heidelberg; 2012.
2. Medscape.com [site na Internet]. Copyright © 1994-2015 by WebMD LLC. <http://emedicine.medscape.com/article/804757>. Acesso: 08/10/2015.
3. Mak CM, Lee HCH, Chan AYW, Lam CW. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013; 50(6): 142–162.
4. Ginocchio VM, Pierri NB. Progress toward improved therapies for inborn errors of metabolism. *Human Molecular Genetics*. 2015, 1–9.
5. Sparks SE. Update on Newborn Screening. *N C Med J*. 2013;74(6):514-517.
6. Ozbem T. Expanded newborn screening and confirmatory follow-up testing for inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51(1): 157–176.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral de Atenção Especializada. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal / Ministério da Saúde, Secretaria de Assistência à Saúde, Coordenação-Geral de Atenção Especializada. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
8. Bradford LT, Adams J. Newborn screening in North America. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:447-465.
9. Baby's first test.org [site na Internet]. © 2015 Baby's First Test. Health Resources and Services Administration (HRSA) of the U.S. Department of Health and Human Services (HHS). <http://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/states>. Acesso: 12/11/2015.
10. Bodamer AO, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:349-444.
11. Borrajo GJC. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:466–481.
12. Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional.org.br [site da Internet]. Copyright © Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional. Todos os Direitos Reservados; Curitiba, Paraná. <http://www.fepe.org.br/>. Acessado em 20/10/2015.
13. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clinical Chemistry*. 2003; 49:11 1797-1817.
14. Giugliani R. Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35:871-877.

15. Parenti ISG, Andria G. Universal screening for inherited metabolic diseases in the neonate (and the fetus). *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2012; 25(S5): 4–6.
16. Centers for Diseases Control and Prevention. Using tandem mass spectrometry for metabolic disease screening among newborns: a report of a work group. *MMWR* 2001; 50 (No.RR-3): 1-22.
17. Yoon HR. Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 20:119-124.
18. Feuchtbaum L, Lorey F, Faulkner L, Sherwin J, Currier R, Bhandal A, et al. California's Experience Implementing a Pilot Newborn Supplemental Screening Program Using a Tandem Mass Spectrometry. *Pediatrics*. 2006; 117;S261-S262.
19. Lim JS, Tan ES, John CM, Poh S, Yeo SJ, Ang JSM, et al. Inborn Error of Metabolism(IEM) screening in Singapore by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI/MS/MS): An 8 year journey from pilot to current program. *Molecular Genetics and Metabolism* 113 (2014) 53–61.
20. Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, Olgemoller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1399-406.
21. Waisbren SE, Albers S, Amato S, Ampola M, Brewster T, Demmer L, et al. Effect of Expanded Newborn Screening for Biochemical Genetic Disorders on Child Outcomes and Parental Stress. *JAMA*. 2003 Nov 19;290(19):2564-72
22. Gurian EA, Kinnamon DD, Henry JJ, Waisbren SE. Expanded Newborn Screening for Biochemical Disorders: The Effect of a False-Positive Result. *Pediatrics*. 2006 Jun;117(6):1915-21.
23. Francescatto L, Katsanis N. Newborn screening and the era of medical genomics. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2015.09.010>. Published Online: October 20, 2015.
24. Reinstein E. Challenges of using next generation sequencing in newborn screening. *Genet. Res., Camb.* 2015, vol. 97, e21.