



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO  
PROFISSIONAL**  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS  
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO  
ADMINISTRATIVO – FUNDAP



JÉSSICA MARQUES CALLES  
VANESSA SILVA BOMFIM

Triagem de Doenças Raras no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**RIBEIRÃO PRETO  
FEVEREIRO 2015**

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP  
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS-CRH  
GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HUMANOS-GDRH  
CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SUS  
“Dr. Antonio Guilherme de Souza”  
SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA  
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP**

**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL MICROTÉCNICAS E METAIS**

**Jéssica Marques Calles**

**Vanessa Silva Bomfim**

Triagem de Doenças Raras no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Monografia apresentada ao Programa  
de Aprimoramento Profissional - SES-  
SP, elaborada no Hospital das  
Clínicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto – USP, Departamento  
de Apoio Médico.  
Área Microtécnicas e Metais

Orientador: Tânia Maria Beltramini  
Trevilato  
Coorientador: Dr. José Simon Camelo  
Jr

**Ribeirão Preto**

**2015**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Deus, pelo dom da vida e por sempre iluminar nossos caminhos.

Aos nossos pais e familiares, por acreditarem em nós e em nosso sucesso.

Aos amigos que nos deram palavras de apoio e perseverança em todos os momentos.

A nossa querida orientadora, Tânia Maria Beltramini Trevilato por fazer a diferença em nosso aprimoramento profissional sempre com confiança, paciência, dedicação e amizade.

Ao técnico de laboratório e amigo, Marcos Paulo de Souza Muniz pela atenção e por tornar nossa rotina sempre mais agradável com sua alegria contagiante.

Ao Prof. Dr. José Simon Camelo Jr pelos momentos de orientação.

Ao Departamento de Pediatria e seus funcionários que participaram direta e indiretamente do nosso ano aqui presente.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pela oportunidade de nos tornarmos profissionais melhores.

**“O que vale a pena ser feito, vale a pensa ser bem feito.”**

## RESUMO

Doença Rara, segundo a OMS, é a doença que afeta até 65 em cada 100 mil pessoas. Estima-se que existam 7.000 doenças raras no mundo, afetando 6% a 8% da população. Sua origem é principalmente genética e a maioria se manifesta no início da vida. Coletivamente essas doenças criam um crescente problema diagnóstico, porque algumas são tratáveis, se diagnosticadas cedo. A triagem neonatal é um dos vários programas de triagem empregada tanto para o diagnóstico precoce (período neonatal) de doenças genéticas quanto de doenças infecciosas. No Brasil pode ser realizada em rede pública (diagnosticam até seis doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias, fibrose cística, deficiência da biotinidase e hiperplasia adrenal congênita, dependendo do estado); ou pela rede particular que diagnosticam aproximadamente 30 doenças. O “teste do pezinho” deve ser realizado obrigatoriamente em todos os recém-nascidos, mas através de dados do Ministério da Saúde, em 2000, menos da metade dos recém-nascidos brasileiros realizaram esse teste. Atualmente, os métodos mais avançados para a triagem são a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/MS) e a Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massa em *Tandem* (UPLC-MS/MS). Cerca de 30 doenças genéticas podem ser triadas em uma única análise com amostras de sangue e urina. O objetivo do trabalho é planejar procedimento operacional padrão para utilização dos equipamentos CG/MS e UPLC-MS/MS no HCFMRP-USP no Laboratório de Pediatria que auxiliará na triagem de Doenças Raras. O UPLC-MS/MS realizará as dosagens e avaliações das concentrações dos elementos abaixo em amostras sanguíneas coletadas previamente em papel de filtro. Os aminoácidos detectarão aminoacidopatias; a succinilacetona detectará a aminoacidopatia tirosenemia tipo 1; carnitinas livres e acilcarnitinas detectarão os defeitos de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e acidúrias orgânicas. O preparo das amostras poderá ser realizado por metodologia denominada *in house*, produção caseira, ou por meio de *kits* prontos. O CG/MS realizará dosagens de ácidos orgânicos, com amostras urinárias, para detecção de defeitos dos mesmos e a preparação das amostras será feita por técnicas *in house*. Aprimorando o escopo de exames realizados e destes equipamentos no HCFMRP-USP, cumprimos a Portaria N° 199 de Janeiro de 2014 para detecção de Doenças Raras.

Palavras-chave: Doenças raras. Triagem Neonatal. Espectrometria de massa. Cromatografia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACMG</b>	American College of Medical Genetics
<b>CG/MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>DB</b>	Deficiência da Biotinidase
<b>DOAG</b>	Distúrbios da Oxidação de Ácidos Graxos
<b>DR</b>	Doenças Raras
<b>DRS</b>	Divisão Regional de Saúde
<b>EIMs</b>	Erros Inatos do Metabolismo
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FC</b>	Fibrose Cística
<b>HAC</b>	Hiperplasia Adrenal Congênita
<b>HC</b>	Hipotireoidismo Congênito
<b>HCFMRP</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<b>HCRP</b>	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
<b>MCAD</b>	Deficiência da Acil CoA Desidrogenase de Cadeia Média
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massa em <i>Tandem</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PKU</b>	Fenilcetonúria
<b>PNTN</b>	Programa Nacional de Triagem Neonatal
<b>PTN</b>	Programa de Triagem Neonatal
<b>RN</b>	Recém-nascido

<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TN</b>	Triagem Neonatal
<b>TSH</b>	Hormônio Tireoidiano estimulante
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UPLC-MS/MS</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Performace acoplado à Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celcius
<b><i>m/z</i></b>	relação massa/carga
<b>mL</b>	mililitros
<b>μl</b>	microlitros
<b>mm</b>	mililitros
<b>±</b>	mais ou menos
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>pol</b>	polegada
<b>%</b>	porcentagem



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Situação do credenciamento dos diferentes estados para a realização da triagem neonatal (fases do PNTN).....	17
Figura 2 -	Tipos de cromatografia.....	20
Figura 3 -	Representação esquemática de um espectrômetro de massas.....	22
Figura 4 -	Modelo de um UPL-MS/MS e de um CG/MS, respectivamente..	23
Figura 5 -	Coleta do material do teste do pezinho.....	25

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 Conceito e História.....	10
1.2 Classificação.....	11
1.3 Triagem Neonatal.....	13
1.4 Triagem de EIM.....	18
1.4.1 Introdução aos métodos cromatográficos.....	19
1.4.2 Espectrometria de massa.....	22
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 UPLC-MS/MS.....	26
3.2 CG/MS.....	31
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Conceito e História

O interesse pelas doenças raras tem aumentado nos últimos anos, paralelamente ao reconhecimento de que representam um problema de saúde pública. A última década concentrou o desenvolvimento da maior parte dos programas oficiais para doenças raras em várias partes do mundo (INTERFARMA, 2013).

O conceito de Doença Rara (DR), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a doença que afeta até 65 pessoas em cada 100 mil indivíduos, ou seja, 1,3 para cada 2 mil pessoas. As doenças raras são caracterizadas por uma ampla diversidade de sinais e sintomas e variam não só de doença para doença, mas também de pessoa para pessoa acometida pela mesma condição (RODRIGUES, 2013).

Estima-se que existam cerca de 7.000 doenças raras no mundo. Se individualmente atingem um número restrito de pessoas, em conjunto afetam uma parcela considerável da população mundial – entre 6% e 8%, ou 420 milhões a 560 milhões de pessoas. Desse total, aproximadamente 13 milhões estão no Brasil, segundo estas estimativas (INTERFARMA, 2013).

Em torno de 80% das doenças raras tem origem genética. O restante decorre de infecções bacterianas e virais, alergias, ou causas degenerativas. A maioria das doenças raras (75%) se manifesta no início da vida e afeta, sobretudo, crianças de 0 a 5 anos. Elas contribuem ainda significativamente para a morbimortalidade nos primeiros 18 anos de vida (INTERFARMA, 2013).

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIMs) são classificados em doenças raras com origem genética, geralmente correspondem a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica. Ocasionalmente, portanto, alguma falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo. Tais erros do metabolismo são considerados a causa das doenças metabólicas hereditárias em que a ausência de um produto esperado, acúmulo de substrato da etapa anterior à interrompida ou o surgimento de uma rota metabólica alternativa podem levar ao comprometimento dos processos celulares (ARAUJO, 2004; SOUZA, 2002).

Até o momento foram identificados cerca de 1000 EIM (SCRIVER et al, 2011). Em sua maioria são herdados de forma autossômica recessiva. Sua incidência individual é rara, no entanto quando contabilizados em conjunto sua frequência é estimada em 1/1.000 recém-nascidos vivos, uma incidência significativa coletivamente. É importante considerar que essa incidência, apesar de baixa, pode ser pela raridade dos distúrbios, como também pela subestimação do diagnóstico.

Em grande parte, são doenças que afetam todo organismo e podem se manifestar em qualquer faixa etária (ARAUJO, 2004; MARTINS, 1999). A maioria das doenças é rara, mas coletivamente elas criam um crescente e importante problema diagnóstico, porque algumas são tratáveis hoje em dia, se diagnosticadas suficientemente cedo.

O termo EIM foi descrito em 1908 por Archibald Garrod, para se referir a algumas situações clínicas. A primeira doença estudada foi a alcaptonúria (aumento da excreção do ácido homogentísico, que leva a artrite, e a urina fica escura após algumas horas em contato com o ar). Posteriormente descreveu o albinismo, cistinúria e a pentosúria. Esses distúrbios foram atribuídos à atividade deficiente ou ausente de uma enzima responsável por um passo específico de uma rota metabólica, cujo bloqueio levava ao acúmulo do substrato e/ou falta do produto (HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006).

Em 1934, foi descoberto que a fenilcetonúria, ou seja, uma doença causada pelo acúmulo do aminoácido fenilalanina no organismo poderia levar a uma grave deficiência mental, mas que o tratamento poderia ser feito pela restrição no aminoácido na dieta do paciente.

## 1.2 Classificação

Os erros inatos do metabolismo são classificados de diversas formas, mas podem ser classificados em três grupos quanto às suas principais manifestações clínicas (HUSNY; FERNANDES-CALDATO, 2006):

**Grupo 1:** Defeitos no metabolismo intermediário. Podem ter intoxicações agudas ou crônicas. Entre elas:

- Aminoacidopatias: Fenilcetonúria, Tirosinemias, etc.;

- Acidemias orgânicas;
- Doenças do ciclo da uréia;
- Intolerância aos açúcares: Galactosemia, Intolerância à Frutose.

As principais manifestações clínicas de intoxicações agudas do grupo 1 são: acidose metabólica, desidratação, alcalose respiratória, vômitos, hiperamonemia, letargia e coma, hipoglicemia, cetose, hiperglicemia, icterícia, insuficiência hepática, hepatomegalia, complicações tromboembólicas, odores anormais.

**Grupo 2:** Defeito na produção e utilização de energia; metabolismo intermediário de fígado, cérebro e músculos.

- Doenças de depósito de glicogênio;
- Hiperlacticemias congênitas;
- Doenças mitocondriais;
- Defeito de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos: Cadeia muito longa, Cadeia longa, Cadeia média, Cadeia curta, Déficit de Transporte de Carnitina, etc.

Manifestações clínicas das doenças do grupo 2 em todas as faixas etárias: hipoglicemia, hepatomegalia, hiperlacticemia, cardiomiopatia, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, déficit de crescimento, diabetes, hepatopatia, miopatia, surdez, morte súbita, odores anormais, alterações oculares, abortos repetidos, alterações renais, convulsões.

**Grupo 3:** Defeito de síntese ou catabolismo de moléculas complexas (doenças de depósito). Sinais e sintomas permanentes e progressivos.

- Doenças lisossomiais: Mucopolissacaridoses, Esfingolipidoses, Glicoproteinoses, Distúrbios do Transporte de Membrana;
- Doenças peroxissomiais: Zellweger, Adrenoleucodistrofia, etc.

Manifestações clínicas das doenças do grupo 3 em todas as faixas etárias: hidropsia fetal (ascite), hepatoesplenomegalia, alterações esqueléticas, hipotonia e convulsões, fácies grotesco, neurodegeneração aguda, mieloneuropatias subagudas, achados dismórficos, discrasias sanguíneas, alterações oculares, alterações de pele, limitação articular, deficiência auditiva.

### 1.3 Triagem Neonatal

A triagem neonatal (TN) é um dos vários programas de triagem populacional existentes. Atualmente, é empregada tanto para o diagnóstico precoce (no período neonatal, ou seja, entre 0 a 28 dias de vida) de doenças genéticas – geralmente erros inatos do metabolismo – quanto de doenças infecciosas. Neste tipo de triagem (SCHWARTZ; NETO; GIUGLIANI, 2000):

- os testes (qualitativos, semiquantitativos ou quantitativos) são realizados em amostras de sangue colhidas em papel filtro preferencialmente entre o 2º e o 5º dias de vida do recém-nascido (1ª amostra - não deve ser coletado a mais de 7 dias);
- os resultados alterados são confirmados através de testes mais específicos (em sua maioria quantitativa), preferencialmente realizados em amostras de soro, sangue total ou urina (2ª amostra);
- os casos confirmados são encaminhados para tratamento específico e/ou investigações adicionais em serviços de referência.

Os Estados Unidos da América (EUA) é o país mais evoluído frente a um projeto de TN. Possuem leis estaduais que tornam a TN obrigatória e uma responsabilidade de saúde pública. O sistema de saúde é custeado de diferentes maneiras, sendo aproximadamente cinquenta por cento com recursos privados.

O American College of Medical Genetics formou um grupo multidisciplinar, o Newborn Screening Expert Group que revisou toda a estrutura da TN nos diversos estados e definiu um painel de 29 doenças para a triagem neonatal. Foram listadas nove doenças do metabolismo dos ácidos orgânicos (Acidemia isovalérica, Acidemia Glutárica I, Acidúrias da HMG-CoA redutase, Acidemia metilmalônica (deficiência de mutase), Deficiência de carboxilase 3-metil-crotonil-CoA, Acidemia metilmalônica (Cbl A,B), Acidemia propiônica, Deficiência de  $\beta$ -Cetotiolase), cinco do metabolismo dos ácidos graxos (Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia média, Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa, Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa, Deficiência de proteína trifuncional, Defeito de captação da carnitina), seis do metabolismo dos aminoácidos (Fenilcetonúria, Doença do Xarope de Bordo, Homocistinúria, Citrulinemia, Acidemia argininosuccínica e Tiroseemia I) triadas por métodos de espectrofotometria de massa em *Tandem* (MS/MS), além da doença falciforme (HbSS<sup>a</sup>, HbS/ $\beta$ , HbS/C) e duas outras doenças hematológicas, hipotireoidismo congênito, galactosemia,

hiperplasia adrenal congênita, fibrose cística, deficiência de biotinidase e surdez, triadas por outros métodos (ACMG, 2006; LEÃO; AGUIAR, 2008).

No Canadá, apenas uma província (Saskatchewan) tem lei que obriga a TN para a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congênito. As demais províncias e territórios "confiam nos padrões da boa prática médica como encorajamento para a TN adequada". O governo não tem qualquer participação nos Programas de Triagem Neonatal (PTN), nem existe qualquer estratégia nacional que orientem os seus desempenhos (BOTLER, 2010).

No que se refere à Europa, o desenvolvimento da TN tem sido lento e heterogêneo - mais rápido nos países ocidentais e mais lento no Leste Europeu. Estima-se que a cobertura global da TN em toda a Europa é em torno de 69%. Este dado pode estar subestimado, visto que, no levantamento não há informações de países como Albânia, Armênia, Azerbaijão, Geórgia, Hungria, Macedônia, Turquia e Moldávia. Em janeiro de 2007, sete países tinham expandido a sua triagem, sendo que a maioria deles iniciou após 2004 (BOTLER, 2010).

Em países asiáticos, em que a taxa de mortalidade infantil é menor do que 10/1.000 nascido-vivos, os PTN têm alcançado coberturas superiores a 90%. Entre os demais países, com mortalidade infantil superior, a Tailândia foi o único a alcançar uma boa cobertura de TN (~97%).

A China, apesar do intenso crescimento econômico, demonstra claramente os problemas a um país de grande extensão territorial e grande iniquidade no acesso a saúde. Nos grandes centros econômicos, a cobertura é plena, porém a cobertura global não passa dos 25% da população neonatal.

Na Austrália e no Japão, realiza-se a triagem ampliada sem restrições (LEÃO; AGUIAR, 2008). O Norte da África e Oriente Médio, encontram-se no início das discussões sobre implementação da TN.

A América Latina é uma região composta por vinte países e com uma natalidade aproximada de 11,2 milhões de crianças por ano. Em 2005, 49% destas foram submetidas à TN.

A TN na América Latina teve início na década de setenta, a partir de iniciativas no México (Velásquez) e Brasil (Schmidt). Para Borrajo, os países da América Latina podem ser agrupados em seis categorias, conforme o grau de implementação e cobertura dos PTN: Grupo I (Cuba, Costa Rica, Chile e Uruguai) - países com programas mais organizados. As coberturas estão em torno de 100% e

as etapas da TN até o tratamento estão a cargo dos governos; Grupo II (Brasil, México e Argentina) - países com sistemas de saúde complexos. Por muitos anos, o setor privado foi o maior responsável pelo financiamento da TN, alcançando coberturas entre 60 e 80% em 2005; Grupo III (Colômbia, Paraguai e Venezuela) - a implementação de programas no nível nacional é bem mais recente (começando em 1999), com coberturas inferiores às dos grupos I e II; Grupo IV (Nicarágua e Peru) - os PTN só começaram a se organizar nos últimos dois anos e suas coberturas estão entre 4% e 6%; Grupo V (Guatemala, República Dominicana, Bolívia, Panamá e Equador) - as atividades de TN são mínimas, realizadas pelo setor privado, com coberturas inferiores a 1%; Grupo VI (El Salvador, Honduras e Haiti) – a TN é praticamente inexistente (BOTLER, 2010).

No Brasil, atualmente, a triagem neonatal pode ser realizada em rede pública, onde conseguem diagnosticar até seis doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias, fibrose cística, deficiência da biotinidase e hiperplasia adrenal congênita, dependendo do estado; ou realizada pela rede particular que diagnosticam aproximadamente 30 doenças metabólicas.

O “teste do pezinho” deve ser realizado obrigatoriamente em todos os recém-nascidos, mas através de dados extraoficiais do Ministério da Saúde, no ano de 2000, menos da metade dos 3.000.000 RNs brasileiros nascidos vivos realizaram esse teste (alguns RNs podem ter realizado o teste em laboratórios privados que não informam seus dados para as estatísticas oficiais) (CARVALHO et al, 2007).

Além da falta de cobertura, também existe a falta de um sistema de controle de qualidade, fundamental para a análise de outras variáveis importantes na otimização de um programa de TN: idade de coleta da primeira amostra, tempo decorrido entre a coleta e a entrada do material no laboratório, tempo decorrido entre a entrada do material no laboratório e a comunicação do resultado aos pais, idade de início do tratamento etc. (SOUZA; SCHWARTZ; GIUGLIANI, 2002).

No Brasil o início da instalação dos programas de triagem aconteceu de uma forma lenta e desorganizada, sem estrutura de controle de qualidade o que ocasionou a discussão ética em torno do assunto.

Em 1990, devido à introdução da Lei Federal N° 8069 de 13 de setembro de se tornou obrigatório o exame do pezinho para todas as crianças nascidas no país, tanto na rede pública quanto na rede privada. A Sociedade Brasileira de Triagem



Neonatal nasceu em setembro de 1999 com o objetivo de reunir todos os serviços já existentes pelo país e os profissionais ligados a eles.

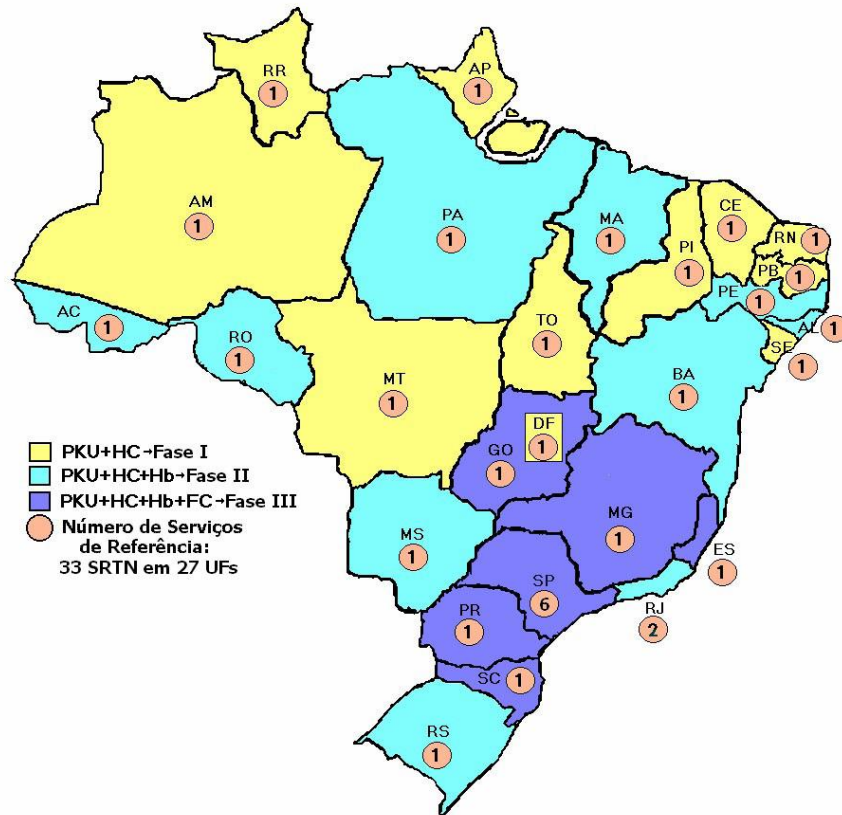
A partir da PORTARIA nº 822, de 06 de junho de 2001, do Ministério de Saúde foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Este programa obriga a realização dos testes para hipotireoidismo congênito (HC), fenilcetonúria (PKU), hemoglobinopatias e fibrose cística (FC) de forma gratuita para todos os RN brasileiros. Os seus objetivos são ampliar a triagem neonatal, ampliar a cobertura populacional da triagem neonatal para 100% dos nascidos vivos, realizar a busca ativa de pacientes suspeitos de serem portadores das patologias, a confirmação diagnóstica, o acompanhamento e tratamento adequado dos pacientes e criar um sistema de informações para cadastrar todos os pacientes num Banco de Dados Nacional (BRASIL, 2004).

De acordo com a PORTARIA Nº 822, o pagamento da triagem neonatal pelo Governo Federal estaria vinculado à organização de redes de coleta, diagnóstico e tratamento; somente os estados com cobertura maior de 50% poderão realizar triagem para hemoglobinopatias e com cobertura maior de 70% para fibrose cística (os estados com cobertura inferior podem triar para o hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria), dividindo os estados brasileiros em 3 fases de acordo com as doenças rastreadas (BRASIL, 2004):

- Fase I = diagnóstico de HC e PKU;
- Fase II = diagnóstico de HC, PKU e hemoglobinopatias;
- Fase III = diagnóstico de HC, PKU, hemoglobinopatias e FC.

Nesta época todos os estados brasileiros estavam habilitados no PNTN com pelo menos um serviço de referência credenciado pelo Ministério da Saúde, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 – Situação do credenciamento dos diferentes estados para a realização da triagem neonatal (fases do PNTN).



Fonte: USP, 2011.

Depois da instalação da Lei Federal nº 8069 de 13 de Julho de 1990, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) fechou um convênio com a APAE de São Paulo para a realização da fenilcetonúria e com a Universidade Federal de São Paulo para a realização do TSH neonatal. Dessa forma o HCRP implantou o seu PNTN para Hipotireoidismo Congênito em 1994 e de Fenilcetonúria em 1995. E já em agosto de 1996 através desse programa, começou a atender tanto as crianças do hospital quanto todas as crianças nascidas nos municípios que compõem a Divisão Regional de Saúde (DRS) de Ribeirão Preto (DRS13).

A partir de janeiro de 2002 foi obrigatório além da pesquisa neonatal de Hipotireoidismo Congênito e da PKU, a triagem da anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, devido ao fato de que o Laboratório de *Screening* do HCRP foi credenciado pelo Ministério da Saúde como um dos centros de referência em Triagem Neonatal do Estado de São Paulo (fase II) (MAGALHÃES et al, 2009).

No mesmo ano, novembro de 2002, o PTNT do HCRP se responsabilizou a realizar os testes em crianças das cidades pertencentes à DRS de Franca (DRS 8) e, a partir de fevereiro de 2003, aos da DRS de Barretos (DRS 5).

Em 2010, todo o Estado de São Paulo passaria para a fase III do Projeto Nacional de Triagem Neonatal, onde se realiza também a triagem de fibrose cística. O HCRP cumprindo o prazo previsto pela Justiça Federal aderiu essa solicitação em fevereiro do mesmo ano.

Na PORTARIA nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012 o Ministério da Saúde autorizou a ampliação do Teste do Pezinho (fase IV) incluindo mais duas patologias: Deficiência da Biotinidase (DB) e a Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) (BRASIL, 2012); considerando a PORTARIA Nº 506, de 6 de maio de 2013, que o estado de São Paulo está apto a iniciar a implantação da Fase IV – TNN (BRASIL, 2013). O HCRP implementou esses exames em novembro do mesmo ano.

A Portaria Nº 199 de Janeiro de 2014 para detecção de Doenças Raras instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às DRs, aprovando as diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com DR no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), instituindo incentivos financeiros de custeio.

#### **1.4 Triagem de EIM**

Atualmente, sabe-se que os métodos mais avançados para a triagem da maioria dos erros inatos são a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/MS) e a Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massa em *Tandem* (UPLC-MS/MS). Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, esses métodos ocupam um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos (COLLINS,1997).

Cerca de 30 deficiências metabólicas genéticas podem ser triadas em uma única análise com amostras de sangue coletados em papel de filtro e amostras urinárias. Por exemplo: a dosagem de carnitina livre e acilcarnitinas, marcadores dos distúrbios da oxidação de ácidos graxos (DOAG).

A oxidação de ácidos graxos é necessária para a produção de energia quando os níveis de glicose estão baixos. Os indivíduos que possuem os DOAG são incapazes de oxidar tais substâncias para produzir energia, devido à ausência ou

mau funcionamento de uma enzima específica. Sem esse fornecimento de energia, alguns indivíduos podem ter incidências recorrentes de hipoglicemia e nos casos de jejum prolongado e quadros infecciosos, pode ocorrer crise metabólica.

A principal deficiência relacionada ao DOAG é a deficiência da enzima Acil CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD), na qual os ácidos graxos de cadeia média octanoato, decanoato e cis-4-decenoato são acumulados nos tecidos (SCHUCK et al, 2009). Os indivíduos afetados podem apresentar sérias complicações afetando o sistema nervoso central, o fígado, o coração, os músculos esqueléticos e a retina, devido ao acúmulo excessivo desses ácidos graxos em alguns desses órgãos.

Sabe-se que parte das crianças com deficiência de MCAD são normais ao nascimento, mas geralmente apresentam sintomas clínicos como vômitos, diarréia, letargia, hipoglicemia, encefalopatia aguda, convulsões e/ou coma, até o terceiro dia de vida. Muitos desses sintomas clínicos podem causar morte e 30% podem morrer no primeiro episódio dos sintomas. A incidência dessa doença é de 1:6500 a 1:20000, e é responsável por 3% dos casos da Síndrome de Morte Súbita na Infância (SOUZA, 2002).

O tratamento consiste em evitar o jejum, reduzir as gorduras da dieta e suplementar carnitina. Nos programas de TN dos países do Primeiro Mundo, a triagem e diagnóstico da MCAD são realizados pela medida da octanoilcarnitina em amostras de sangue coletadas em papel de filtro através da espectrometria de massa MS/MS (SOUZA, 2002).

#### **1.4.1 Introdução aos métodos cromatográficos**

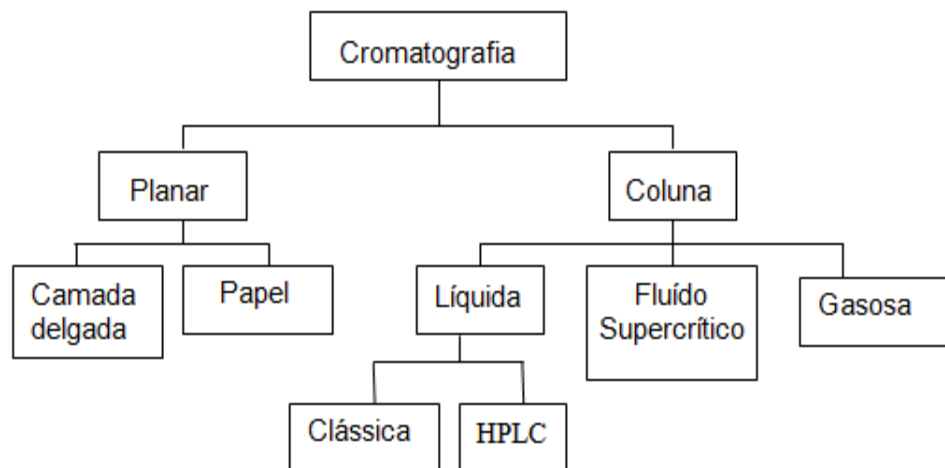
A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhum outro método de separação é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia (SKOOG; WEST; HOLLER; STANLEY, 2007).

O termo cromatografia é difícil de ser definido rigorosamente, porque o nome tem sido aplicado a diversos sistemas e técnicas. Todos esses métodos, contudo, apresentam em comum o uso de uma fase estacionária e de uma fase móvel. Os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo

fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel (SKOOG; WEST; HOLLER; STANLEY, 2007).

Diferentes critérios são utilizados para distinguir os métodos cromatográficos, estes podem ser separados quanto ao mecanismo de separação, técnica empregada, tipo de fase utilizada e tipo de superfície na qual ocorre a separação. No entanto, a classificação mais popular é a que leva em consideração o tipo de superfície na qual ocorre a separação (Fig. 2), sendo dividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar (LANÇAS, 1993).

Figura 2 - Tipos de Cromatografia.



Fonte: DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998.

As cromatografias mais aplicadas são a gasosa e a líquida, devido a sua capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (CEFET, 2014).

Tanto a fase móvel quanto a estacionária devem ser cuidadosamente escolhidas, pois são componentes críticos da análise.

A fase móvel em Cromatografia Gasosa (CG) é denominada gás de arraste e deve ser de alta pureza e quimicamente inerte (não interagir com as moléculas do analito); sua função é só transportar o analito através da coluna. O hélio é a fase móvel gasosa mais comum, embora o argônio, o nitrogênio e o hidrogênio sejam

também empregados. A fase estacionária pode ser líquida ou sólida, sendo que esta última tem uma aplicação limitada. A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Na cromatografia líquida a fase estacionária utilizada pode ser um sólido ou um líquido e como fase móvel utiliza-se um líquido no qual o soluto está dissolvido, assim, enquanto a fase móvel elui sobre a fase estacionária os solutos são separados de acordo com a interação destes com as fases, sendo eluído primeiro os que têm maior afinidade com a fase móvel e posteriormente os que têm maior afinidade com a fase estacionária (RUTZ, 2009).

A cromatografia líquida pode ser dividida em: Cromatografia Líquida Clássica (CLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Recentemente, a técnica de separação mais avançada é a UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) que baseia-se nos mesmos princípios da HPLC.

Depois que as amostras são separadas elas passam por um detector para que os componentes das amostras sejam identificados e quantificados continuamente. Esse detector produz um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de um gráfico pelo sistema de dados.

Para que o detector seja considerado ideal deve apresentar as seguintes características (SKOOG; WEST; HOLLER; STANLEY, 2007):

- a) Sensibilidade adequada;
- b) Boa estabilidade e reprodutibilidade;
- c) Resposta linear aos solutos que se estenda a várias ordens de grandeza;
- d) Faixa de temperatura desde a ambiente até pelo menos 400°C;
- e) Um tempo de resposta curto e independente da vazão;
- f) Uma alta confiabilidade e facilidade de uso. O detector deve, na medida do possível, tolerar a ação de operadores inexperientes;
- g) Similaridades de resposta a todos os solutos ou, alternativamente, uma resposta altamente previsível e seletiva a uma ou mais classes de solutos;
- h) Não deve destruir a amostra.

Alguns dos detectores mais utilizados são: ionização em chama, condutividade térmica, captura de elétrons entre outros. Atualmente, espectrômetros de massa têm sido acoplados a equipamentos de cromatografia gasosa e líquida,

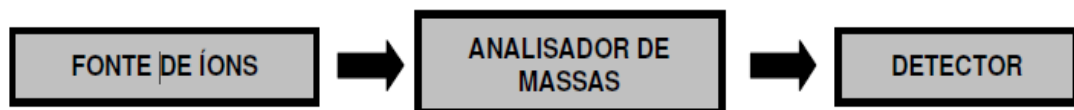
possibilitando a identificação imediata das substâncias presentes na amostra (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

### 1.4.2 Espectrometria de massa

Espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida designada por  $m/z$  (relação massa/carga). Assim, conhecendo o valor de  $m/z$  de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998).

Um espectrômetro de massas é composto por três módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores conforme a Figura 3:

Figura 3 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas.



Fonte: SOUZA, 2008.

As moléculas da amostra entram em uma fonte de íons onde sofrem a ionização (processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon, adicionando ou removendo partículas carregadas como elétrons ou outros íons).

As fontes de ionização para a espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes. No impacto de elétrons as moléculas são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia, produzindo íons positivos, íons negativos e espécies neutras (SKOOG; WEST; HOLLER; STANLEY, 2007).

Depois vem a fase aonde os íons positivos vão para o analisador, que serve para seleccioná-los de acordo com seus valores  $m/z$ . Os íons separados são então encaminhados para os detectores que tem como função detectar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferir o sinal para o sistema de processamento de dados. No final, o sistema de dados detectados produz um gráfico mostrando a intensidade do sinal gerado pelo íon versus  $m/z$ .

A espectrometria de massas tem se tornado cada vez mais indispensável na caracterização estrutural de biomoléculas. Devido à sua alta sensibilidade e rápida análise, ela é a técnica de primeira escolha nos processos analíticos. Suas aplicações são ilimitadas, podendo ser utilizadas na caracterização de proteínas e peptídeos, carboidratos como oligossacarídeos e glicoconjugados, lipídeos, produtos do metabolismo secundário, entre outras aplicações (SOUZA, 2008).

Figura 4 – Modelo de um UPL-MS/MS e de um CG/MS, respectivamente.



Fonte: CEPC, 2014; PROPES/UFABC, 2014.



## **2 OBJETIVO**

Planejar procedimento operacional padrão para utilizar os equipamentos UPLC-MS/MS e CG/MS no Laboratório de Pediatria do HCFMRP-USP, e cumprir a Portaria Nº 199 de Janeiro de 2014 para detecção de Doenças Raras.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

Os EIM serão triados no Laboratório de Pediatria do HCFMRP-USP pelos equipamentos, UPLC-MS/MS e CG/MS e usarão amostras de sangue coletadas em papel de filtro e amostras de urina, respectivamente.

As amostras sanguíneas serão oriundas do Laboratório de Screening (Teste do Pezinho), realizados no próprio hospital. O material é adquirido no Setor de Coleta do HCFMRP-USP para que sejam realizados os exames preconizados pela triagem neonatal de fase quatro e logo após será reencaminhado para o Laboratório de Pediatria.

Figura 5 - Coleta do material do Teste do Pezinho.



Fonte: CEDLAB, 2014.

Atualmente quando se tem uma suspeita clínica a urina é trazida pelos pacientes e são encaminhadas para o Hospital das Clínicas de Porto Alegre - UFRGS, Laboratório de Genética, local que realiza tal triagem no país.

As amostras de urina (40 ml) serão encaminhadas para o Setor de Doenças Raras/Metais do Laboratório de Pediatria do HCFMRP, trazidas congeladas pelos responsáveis dos pacientes em questão e serão armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os ácidos orgânicos serão dosados como descrito posteriormente.

O UPLC-MS/MS realizará as dosagens e avaliação da concentração dos analitos (aminoácidos, succinilacetona, carnitinas livres e acilcarnitinas) em amostras sanguíneas, secas em papel de filtro. Os aminoácidos detectarão aminoacidopatias; a succinilacetona, especificamente, detectará a aminoacidopatia Tiroseemia Tipo 1, sendo esse o seu principal marcador; Carnitinas livres e acilcarnitinas detectarão os defeitos de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e acidúrias orgânicas.

O preparo das amostras poderá ser realizado com a utilização de metodologia denominada *in house*, produção caseira, ou por meio de *kits* prontos.

A análise quantitativa das substâncias dosadas e as demais relações serão utilizadas para fornecer os perfis de concentração com analitos, auxiliando no rastreamento de distúrbios metabólicos genéticos em RN.

Já o CG/MS realizará as dosagens de ácidos orgânicos para detecção de defeitos dos mesmos e a preparação das amostras será feita, por enquanto, somente por técnicas *in house*.

### 3.1 UPLC-MS/MS

#### 3.1.1 Dosagem por kits prontos (NeoBase™ Non-derivatized MSMS kit - PerkinElmer®)

##### 3.1.1.1 Preparação de padrões internos e da solução de trabalho diário:

- a) Reconstitua o frasco dos padrões internos de aminoácidos secos com 1.0 mL da Solução de extração NeoBase e misture bem até dissolver completamente (pode levar até 2 horas). A solução permanece estável por 30 dias se armazenada no frasco original vedado em temperaturas entre +2 e +8°C.
- b) Reconstitua o frasco dos padrões internos de acilcarnitinas secas com 1.0 mL da Solução de extração NeoBase e misture bem. A solução permanece estável por 30 dias se armazenada no frasco original vedado em temperaturas entre +2 e +8°C.
- c) Verifique se os dois frascos de padrões internos reconstituídos e a Solução de extração NeoBase estão em temperatura ambiente (entre +18 e +25°C) antes de usá-los na preparação da solução de trabalho diário.
- d) Prepare a solução de trabalho diário diluindo os padrões internos das etapas a) e b) por um fator de 1:110 na Solução de extração NeoBase. Observação: se estiver testando succinilacetona, consulte a etapa e). Por exemplo, se 11 mL de solução de trabalho diário forem necessários, 0,1 mL de cada padrão interno será diluído em 10,8 mL da solução de extração. Uma maneira de fazer isso é transferir o volume total da solução de extração (11 mL nesse exemplo), remover

0,2 mL e, em seguida, adicionar 0,1 mL de cada padrão interno. Essa será a solução de trabalho diário contendo padrões internos de aminoácidos e acilcarnitinas.

e) Se estiver testando succinilacetona, a Solução de ensaio de succinilacetona NeoBase deve ser adicionada à solução de trabalho diário em uma diluição 1:40. Nesse exemplo, se 11 mL de solução de trabalho diário forem necessários, 0,1 mL de cada padrão interno e 0,275 mL de Solução de ensaio de succinilacetona NeoBase serão diluídos em 10,525 mL da solução de extração. Observação: se não estiver testando succinilacetona pule esta etapa.

f) A solução de trabalho diário deve ser preparada todos os dias e permanece estável por 24 horas. Conserve de preferência a uma temperatura entre +2 e +8°C e sem exposição à luz.

3.1.1.2 Usando um picotador manual ou automático, picote os discos de papel de filtro das manchas secas de sangue para os poços da microplaca transparente, truncada e com fundo em V, a qual foi fornecida. O diâmetro dos discos deve ser de aproximadamente 3,2mm (1/8 pol.). Deve ser adicionado somente um disco por poço. Recomenda-se manter incompletos os primeiros 2 a 4 poços (adicione somente a solução de trabalho diário contendo os padrões internos) para cada placa, a fim de permitir que o sistema LC e o espectrômetro de massas atinjam a sincronização.

3.1.1.3 Usando uma pipeta multicanal e a técnica de pipetagem reversa, adicione 100 µL de solução de trabalho diário a cada poço contendo o disco de papel de filtro. Cubra a placa com uma cobertura adesiva de plástico, garantindo uma boa vedação para minimizar a evaporação.

3.1.1.4 Imediatamente após cobrir a placa, agite-a no incubador/agitador a uma temperatura entre 45°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) por 45 minutos ( $\pm 10$  minutos). A placa pode ser agitada em velocidades atingindo de 650 a 750 rpm.

3.1.1.5 Retire a cobertura adesiva de plástico da placa.

3.1.1.6 Transfira 75 µL do conteúdo de cada frasco para uma microplaca resistente ao calor e com fundo em V. Essa etapa é opcional, mas recomendada.

3.1.1.7 Cubra a placa com folha de alumínio para minimizar a evaporação da solução.

3.1.1.8 Se estiver testando succinilacetona, espere pelo menos 2 horas entre a etapa de transferência e a primeira medição para garantir a completa derivatização da succinilacetona extraída. A manutenção diária e a configuração do instrumento podem ser realizadas durante essa etapa. Essa etapa pode ser ignorada se a succinilacetona não for testada.

3.1.1.9 Coloque a placa no amostrador automático.

3.1.1.10 Para executar o ensaio, inicie o software NeoGram/MassLynx, crie listas de trabalho e use o método apropriado de aquisição de dados.

Algumas observações sobre o procedimento:

- É necessária uma compreensão perfeita desde suplemento para que se faça um bom uso do kit NeoBase Non-derivatized MSMS. Os reagentes fornecidos com este kit devem ser usados como uma unidade integral. Não misture reagentes idênticos de kits que possuam número de lotes diferentes. Não use reagentes de kits após a data de validade impressa no rótulo.
- Qualquer falha no procedimento de ensaio pode afetar os resultados.
- A realização do ensaio sem a etapa de transferência foi validada para até 12 a 14 horas de aquisição contínua. A aquisição por períodos maiores do que o especificado não é recomendado, pois os resultados podem ser afetados.
- Tome cuidado ao usar artigos de plástico para a preparação da amostra. Os plásticos podem liberar substâncias plastificantes na mistura da amostra. Portanto é recomendado preparar a solução de trabalho em frascos de vidro. Se tiver usando artigos de plástico (como pontas de pipetas e tubos Falcon) no ensaio, verifique se os itens podem ser usados com segurança com metanol. O ensaio NeoBase foi validado com as placas fornecidas pelo kit e o uso de outras placas não é recomendado.
- A cobertura adesiva de plástico e a folha de alumínio utilizadas para cobrir a microplaca devem estar bem fixas à superfície da placa e dobradas em todas as laterais, a fim de minimizar a evaporação. Para evitar o derramamento da amostra, sempre retire com cuidado a cobertura de plástico adesiva da placa.

- Use a pipetagem reversa para a adição da solução de trabalho diário aos frascos. A pipetagem reversa geralmente é mais precisa ao liberar pequenos volumes.
- As soluções que já foram retiradas dos frascos de reagente não devem ser reutilizadas.
- Verifique se todos os poços possuem um disco após a perfuração.

O Laboratório de Pediatria deverá realizar um estudo piloto para determinar a distribuição das concentrações de cada analito para sua própria população. A partir destas distribuições, é necessário determinar as médias e os valores de corte (*cutt - off*), usando medidas estatísticas, como percentuais, médias e desvios-padrão em conjunto com especialistas de doenças metabólicas que possam orientar com base nas taxas de incidência, gravidade da doença e perfis típicos de pacientes doentes.

De acordo com os valores determinados pelo kit NeoBase™ Non-derivatized MSMS são descritos três tipos de resultados: positivo presuntivo (resultados que estiverem acima, ou abaixo se houver um corte inferior, dos cortes anormais); limítrofe (resultados que se enquadrarem entre o corte anormal e o corte limítrofe); e negativo presuntivo (resultados iniciais de qualquer amostra que forem inferiores, ou superiores, se houver um corte inferior, a todos os cortes limítrofes e anormais).

### **3.1.2 Dosagem por técnica *in house***

Para que as amostras sejam dosadas por técnicas *in house*, em alguns casos, a substância em questão necessita primeiramente passar por reações químicas que a transformam em um derivado (com estrutura semelhante) com propriedades diferentes como solubilidade, ponto de ebulição, ponto de fusão e o estado de agregação, que facilitará o processo de quantificação e separação. Este processo é denominado derivatização.

A metodologia *in house* ocorre quando se faz a compra de padrões internos deuterados individuais, diretamente de companhias como a Cambridge Isotope Laboratories®, além de insumos necessários para o método, como o fluxo de trabalho descrito pelo grupo do Laboratório de Genética Bioquímica da *Mayo Clinic* (TURGEON et al, 2008).

- 3.1.2.1 Em uma placa de 96 poços, serão colocados os discos de papel de filtro picotados com diâmetro de 3,2 mm em cada poço separadamente;
- 3.1.2.2 Adicionar 300 µL de metanol contendo os padrões internos (aminoácidos, carnitinas e acilcarnitinas) em cada poço. Cobrir a placa e eluir usando um rotor orbital por 30 minutos a 120 rpm;
- 3.1.2.3 Transferir os eluentes de metanol para outra placa de 96 cavidades, deixando os discos de papel de filtro residual para eluição subsequente de succinilacetona durante 30 min. a 65°C com adição de acetonitrila/água/ácido fórmico (80:20:0,1, vol:vol:vol), que também contém monohidratado de hidrazina 0,1% (15mmol/L) e o padrão interno <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-succinilacetona (0,25 µmol/L);
- 3.1.2.4 Durante a extração da succinilacetona a placa contendo os eluentes de metanol será evaporada sob um fluxo de nitrogênio a 40°C (8-12 minutos);
- 3.1.2.5 Adicionar 50 µL de HCl 3mol/L em n-butanol sob os resíduos, cobrir e incubar durante 15 min. a 65°C;
- 3.1.2.6 Evaporar o reagente em excesso até a secura sob um fluxo de nitrogênio a 40°C (5-7 minutos);
- 3.1.2.7 O resíduo contendo ésteres de butil de aminoácidos e acilcarnitinas será reconstituído em 100 µl de acetonitrila:água:ácido fórmico (50:50:0,02; vol:vol:vol);
- 3.1.2.8 Após a extração da succinilacetona dos resíduos do papel de filtro, os eluentes serão transferidos para outra placa de 96 poços e secos sob um fluxo de nitrogênio a 40°C (aproximadamente 7 minutos);
- 3.1.2.9 Remover qualquer reagente de hidrazina por adição de 100 µl de metanol em cada poço, mexendo e evaporando sob aquecimento de nitrogênio;
- 3.1.2.10 Transferir a fase móvel dos poços contendo os aminoácidos butílicos e acilcarnitinas para os poços correspondentes na placa contendo succinilacetona-hidrazina/resíduos;
- 3.1.2.11 Cobrir a placa e misturar gentilmente por agitação. Estará pronto para análise no UPLC-MS/MS;
- 3.1.2.12 Colocar a placa no amostrador automático.

Para aminoácidos o escaneamento por perda neutra será utilizado (m/z 102) com uma variação de m/z de 140 – 280. Para acil-carnitinas o exame precursor de produtos iônicos m/z 85 será utilizado com uma margem de m/z variando de 210-

502. Para glicina, ornitina, arginina e citrulina, reações múltiplas de monitorização serão utilizadas.

## 3.2 CG/MS

### 3.2.1 Dosagem por técnica *in house* (KIMURA et al, 1999).

A análise de ácidos orgânicos urinários será feita pelo cromatógrafo à gás.

3.2.1.1 Amostras de urina contendo 0,2 mg de creatinina serão analisadas, após centrifugação para remover impurezas (3000 rpm, 10 minutos, 4°C);

3.2.1.2 Serão utilizados como padrões internos o ácido margárico (20µg) e o tetracosano (20µg) e o volume final será ajustado para 2 mL com água destilada;

3.2.1.3 Para oximação de 2-cetoácidos é adicionado 1 mL de cloridrato de hidroxilamina aquosa 5%;

3.2.1.4 Ajustar o pH a 12-14 com NaOH 2N e manter a reação em temperatura ambiente por 60 minutos;

3.2.1.5 Acidificar o pH a 1,0 com 0,2 ml de HCl 6N e a adição 1g de NaCl;

3.2.1.6 Os ácidos orgânicos serão extraídos duas vezes com 6 ml de acetato de etila e uma vez com 6 ml de dietileter;

3.2.1.7 Centrifugar e em seguida a fase orgânica será combinada e desidratada com 5g de sulfato de sódio anidro;

3.2.1.8 Evaporar o sobrenadante com N<sub>2</sub> vagorosamente à 60°C;

3.2.1.9 O resíduo seco será derivatizado por adição de 100 uL de uma mistura de BSTFA (Bis-trimetilsilil trifluoracetamida) e TMCS (trimetilclorosilano) (10:1; v:v), e encubado por 30 minutos à 80°C;

3.2.1.10 Um microlitro de cada amostra do derivado será injetado em um aparelho de cromatografia gasosa GC/MS com uma coluna capilar CP-Sil 8 CB (comprimento de 30m, diâmetro interno de 0,25mm e filme de 0,25µm), um injetor de divisão aberto e o gás carreador será o hélio.

As temperaturas do GC/MS serão programada inicialmente à 100°C por 4 minutos e será aumentado em uma razão de 4°C/minuto para 290°C permanecendo por 10 minutos nesta temperatura. A temperatura do injetor será 280°C. O fluxo do gás hélio será 1,5ml/minuto. Inicialmente o espectrômetro de massa será programado para razão massa carga (m/z) 50-600, em uma razão de 0,4 seg/ciclo.



#### **4 CONCLUSÃO**

De acordo com os materiais e métodos seriam estes os planejamentos dos procedimentos operacionais que utilizaremos.

Sugerimos o escopo destas metodologias para aprimorar os exames realizados e aquisição dos equipamentos no Laboratório de Pediatria do HCFMRP-USP, para detecção de Doenças Raras, cumprindo a Portaria Nº 199 de 30 de Janeiro de 2014.

## REFERÊNCIAS

ACMG- American College of Medical Genetics; **Genetics in Medicine**, 8:1S, 2006.

ARAÚJO, A. P. Q. C. Psychiatric features of metabolic disorders. **Rev. Psiq. Clin.**, 31(6): 285-9, 2004.

BOTLER, J., et al. Triagem neonatal - o desafio de uma cobertura universal e efetiva. **Ciênc. Saúde Coletiva**, vol.15 n.2, RJ; Mar, 2010. Disponível em :< [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232010000200026&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232010000200026&script=sci_arttext)>. Acesso em : 16 mai 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal/ Ministério da Saúde, **Secretaria de Atenção à Saúde**, Departamento de Atenção Especializada. 2. ed. ampl. Brasília, 2004.

BRASIL. Diário Oficial da União. **Portaria nº 2829**, de 14 de dezembro de 2012.

BRASIL. Diário Oficial da União. **Portaria nº 506**, de 6 de maio de 2013.

CARVALHO, T. M., et al. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. **J. Inherit. Metab. Dis.**,30(4):615, 2007

CEDLAB Laboratório. **Teste do Pezinho**. Disponível em: <<http://www.cedlab.com.br/servicos/teste-do-pezinho/>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

CEFET-QUÍMICA (Rio de Janeiro) (Org.). **Análise Instrumental: Cromatografia Líquida de Alta Resolução**. Disponível em: <[http://w.ifrj.edu.br/webfm\\_send/546](http://w.ifrj.edu.br/webfm_send/546)>. Acesso em: 10 out. 2014.

CEPC - Laboratory & Technical Division. **LC/MS-MS**. Disponível em: <<http://cepclab.org.in/?p=1352>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia - Um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**, nº 7, Maio 1998.

HUSNY, A. S.; FRNANDES-CALDATO, M. C. Erros Inatos do Metabolismo: Revisão de Literatura. **Revista Paraense de Medicina**, v.20 (2) abril - junho 2006.

INTERFARMA. Doenças Raras - **Contribuições para uma Política Nacional**. v.5, 2013. Disponível em: < <http://www.interfarma.org.br/uploads/biblioteca/14-Doencas%20Raras%20-%20site.pdf>>. Acesso em: 14 jul 2014.

KIMURA, M., et al. Automated metabolic profiling and interpretation of GC-MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. *Tohoku J. Exp. Med.*, 188: 317-34, 1999.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia em Fase Gasosa*. São Carlos: Acta, 254p, 1993.

LEÃO, L. L.; AGUIAR, M. J. B. Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. *J. Pediatr.* (Rio J).84(4 Suppl):S80-90, 2008. Disponível em: <<http://www.jpmed.com.br/conteudo/08-84-s80/port.asp?cod=1866>>. Acesso em: 16 mai 2014.

MAGALHÃES, P. K. R., et al. Programa de Triagem Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2009;25(2):445-54.

MARTINS, A. M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *São Paulo Med. J./Rev. Paul Med.* 117(6):251-65, 1999.

PROPES/UFABC. **Central Experimental Multiusuário**. Disponível em: <<http://propes.ufabc.edu.br/cem/cgms.html>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

RODRIGUES, G. Doenças raras: um desafio que precisamos vencer juntos. *Revista Saúde Brasil - Saúde & Comunidade*, 2013.

RUTZ, J. K. *Avanços na Cromatografia Líquida*. Trabalho acadêmico (Bacharelado em Química de Alimentos) - **Universidade Federal de Pelotas**, 2009.

SCHUCK, P. F., et al. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochemistry International* 54: 519-525. 2009a.

SCHWARTZ, I. V. D.; NETO, E. C.; GIUGLIANI, R. Considerações sobre o momento da colheita da triagem neonatal. *Jornal de Pediatria*, 76 (6):474-475, 2000.

SCRIVER C. R., et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8ª ed. **New York: McGraw-Hill**, 3-45. 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. **Fundamentos da Química Analítica**. Tradução da 8ª ed. norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.

SOUZA, C. F. M.; SCHWARTZ, I. V.; GIUGLIANI, R. G. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, 7(1): 129-137, 2002.

SOUZA, I. C. N. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento [Tese – Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo – **Escola Paulista de Medicina**; 2002.

SOUZA, L. M. *Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na Caracterização Estrutural de Biomoléculas de Baixa Massa Molecular*. Trabalho

acadêmico (Pós-Graduação em Bioquímica) - **Universidade Federal do Paraná**, 2008.

TURGEON, C., et al. Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. **Clin. Chem.** 54(4): 657-664, 2008.

USP. Manual de Normas Técnicas e Rotinas do Teste de Triagem Neonatal. **Laboratório de triagem neonatal do Hospital das Clínicas de Medicina de Ribeirão Preto**, 2011.

Van BRAMER, S. E. An introduction to mass spectrometry. **Widener University, Chester PA**, 1998.