

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Triagem Neonatal para Atrofia Muscular Espinhal Através de PCR em Tempo Real: Um  
Estudo Piloto no Brasil**

**Alice Brinckmann Oliveira Netto**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani  
Coorientadora: Dra. Ana Carolina Brusius-Facchin

Porto Alegre, fevereiro de 2023

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular, do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; no Laboratório BioDiscovery, do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório do Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Rio Grande do Sul no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas. Teve como instituições financiadoras o Instituto Genética para Todos (Projeto 2020-0705/HCPA). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Pesquisa, vinculada ao PPGBM/UFRGS.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Professor Dr. Roberto Giugliani, pela oportunidade de realizar esse projeto, pela orientação e confiança no meu trabalho, e por todas contribuições para o meu crescimento como profissional, bióloga e pesquisadora;

À minha coorientadora Dra. Ana Carolina Brusius-Facchin, pela presença e disponibilidade, pelo apoio e incentivo contínuo, por todos ensinamentos, oportunidades e experiências;

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e do Laboratório BioDiscovery, obrigada pelo apoio, companheirismo e ensinamentos, em especial à aluna de iniciação científica Julia Feltraco Lemos e à colega de bancada Fernanda Bender Pasetto pelo envolvimento direto nesse projeto, e à Dra. Larissa Faqueti pela ajuda, paciência, conversas e amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelos aprendizados;

Às instituições financiadoras deste projeto, em especial ao CNPq pela bolsa de estudos;

Aos meus amigos, pela presença e apoio constantes, pelas conversas, conselhos e desabafos, pela paciência, companheirismo e carinho ao longo dos anos, em especial à Aléxia Nedel Santana por estar disponível para me ajudar em todas situações;

Aos meus pais, Cristina e Carlos Alexandre, pela paciência durante essa jornada, por serem meus maiores incentivadores e exemplos de pesquisadores e cientistas, e por todo carinho;

À minha irmã Isadora, por vibrar as minhas conquistas, por ser ombro amigo nos momentos difíceis, pelo companheirismo, amizade e segurança;

A todos que, de alguma forma, me auxiliaram e fizeram a diferença para a realização deste projeto, bem como, a todos que contribuíram para minha formação acadêmica e crescimento profissional.

## SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS .....	2
AGRADECIMENTOS .....	3
SUMÁRIO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	8
CAPÍTULO 1.	
INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Atrofia Muscular Espinhal .....	10
1.2. Aspectos Genéticos e Clínicos .....	11
1.3. Diagnóstico Molecular .....	13
1.4. Tratamento.....	14
1.5. Triagem Neonatal .....	15
CAPÍTULO 2.	
OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 3.	
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	19
REFERÊNCIAS .....	22
ANEXOS .....	26
Anexo 1. Termo de Recusa “Teste Opcional e Gratuito - Triagem Neonatal para Atrofia Muscular Espinhal”	
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Anexo 3. Carta de Aprovação do projeto no Hospital de Clínicas de Porto Alegre	

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

ACMG: *American College of Medical Genetics*

AME: Atrofia Muscular Espinhal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASO: Oligonucleotídeo antissenso

Ct: *Threshold Cycle*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMA: *European Medicines Agency*

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration*

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HMIPV: Hospital Materno Infantil Presidente Vargas

MLPA: *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (amplificação multiplex de sondas dependente de ligação)

PCDT: Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCR-SSCP: PCR - *Single Strand Conformation Polymorphism* (polimorfismo de conformação de filamento único)

PCR-RFLP: PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

qPCR: PCR quantitativo

RS: Rio Grande do Sul

RUSP: *Recommended Uniform Screening Panel*

SIPF: Sangue Impregnado em Papel Filtro

SMA: *Spinal muscular atrophy*

SMN: Proteína SMN

SMN1: *Survival of Motor Neuron 1 Gene*

SMN2: *Survival of Motor Neuron 2 Gene*

SRTN: Serviço de Referência em Triagem Neonatal

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## RESUMO

A atrofia muscular espinhal (AME) é caracterizada pela degeneração dos neurônios motores da medula espinhal, causando fraqueza progressiva dos membros e tronco, seguida de atrofia muscular. A condição é considerada uma das doenças de herança autossômica recessiva mais frequentes, com uma incidência mundial estimada de 1 em cada 10.000 nascidos vivos. Alterações no gene *SMN1* causam a doença, sendo que em 95% dos pacientes com AME encontra-se a ausência do exon 7 do gene *SMN1* em homozigose, devido a deleção deste gene ou conversão para o gene *SMN2*, altamente homólogo ao gene *SMN1*. Devido a um espectro uniforme de mutação, a análise mais comumente realizada é a detecção de deleção e conversão gênica dos exons 7 e/ou 8 dos genes *SMN1* e *SMN2*. A AME é uma doença de início infantil e apresenta incidência estimada alta, com isso, a realização de testes de triagem neonatal para detecção de afetados é importante e necessária, uma vez que existem tratamentos disponíveis para a doença, os quais são mais eficazes quando implementados precocemente. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) realiza o teste do pezinho para 6 doenças, coletando e processando amostras de gotas de sangue do calcanhar do recém-nascido, impregnadas em papel filtro. Em maio de 2021, a Lei nº 14.154 foi aprovada para o aperfeiçoamento do PNTN. A proposta desta lei consiste na ampliação das doenças a serem rastreadas pelo teste do pezinho, incorporando aproximadamente mais 50 doenças, de maneira escalonada. A inclusão da AME está prevista para a quinta etapa da ampliação. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um projeto piloto de triagem neonatal para AME no Brasil, através da análise de recém-nascidos do Estado do Rio Grande do Sul, no período de um ano, utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (*SALSA® MC002 SMA Newborn Screen*). As amostras utilizadas foram coletadas nas Unidades Básicas de Saúde pertencentes ao Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Rio Grande do Sul (SRTN/RS) e enviadas ao Hospital Materno Infantil Presidente Vargas para realização do teste do pezinho convencional. Posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ao final de 8 meses do estudo, aproximadamente 25.000 amostras foram processadas e analisadas, possibilitando a identificação de 3 amostras positivas para AME. Estas amostras identificadas como positivas na triagem inicial obtiveram confirmação do resultado por amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA), considerado teste padrão ouro para o diagnóstico. Logo, pode-se concluir que este trabalho demonstrou sua efetividade com a validação da técnica *SALSA® MC002 SMA Newborn Screen* para triagem neonatal de AME no Estado do Rio Grande do Sul utilizando amostras

provenientes do teste do pezinho, sendo uma técnica adequada para inclusão na rotina laboratorial. Ademais, foram obtidos dados populacionais sobre a incidência estimada de AME no Rio Grande do Sul, com base na frequência de casos positivos. Estes dados podem servir como base para o planejamento de estudos mais amplos e para a implantação definitiva da triagem neonatal para AME no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil.

## ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is characterized by degeneration of spinal cord motor neurons, causing progressive weakness of limbs and trunk, followed by muscle atrophy. The condition is considered one of the most common autosomal recessive disorders, with an estimated worldwide incidence of 1 in 10,000 live births. Alterations in the *SMN1* gene cause the disease, and in 95% of patients with SMA, the exon 7 of the *SMN1* gene is absent in homozygosis, due to the deletion of this gene or conversion to the *SMN2* gene, that is highly homologous to the *SMN1* gene. Due to a uniform spectrum of mutation, the most commonly performed analysis is the detection of deletion and gene conversion of exon 7 and/or 8 of the *SMN1* and *SMN2* genes. SMA is a childhood-onset disease and presents a high estimated incidence, therefore, performing newborn screening tests to detect affected individuals is important and necessary, since there are treatments available for the disease, which are more effective when implemented early. In Brazil, the National Newborn Screening Program (PNTN) performs the heel prick test for 6 diseases, collecting and processing samples of blood drops from the newborn's heel, impregnated in filter paper. In May 2021, Law No. 14,154 was approved to improve the PNTN. The proposal of this law consists of expanding the diseases to be screened by the heel prick test, incorporating approximately 50 more diseases, in a staggered manner. The inclusion of the SMA is planned for the fifth stage of the expansion. The present study aimed to develop a pilot project for newborn screening for SMA in Brazil, through the analysis of newborns in the State of Rio Grande do Sul, over a period of one year, using quantitative real-time PCR technique (SALSA® MC002 SMA Newborn Screen). The samples used were collected at the Basic Health Units belonging to the Reference Service in Newborn Screening of Rio Grande do Sul (SRTN/RS) and sent to the Hospital Materno Infantil Presidente Vargas to perform the conventional heel prick test. Subsequently, they were sent to the Molecular Genetics Laboratory of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, where they were processed and analyzed. At the end of 8 months of the study, approximately 25,000 samples were processed and analyzed, allowing the identification of 3 positive samples for SMA. Those samples identified as positive in the initial screening were confirmed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, considered the gold standard test for diagnosis. Therefore, it can be concluded that this work demonstrated its effectiveness with the validation of the SALSA® MC002 SMA Newborn Screen technique for newborn screening of SMA in the State of Rio Grande do Sul using samples from the heel prick test, being an adequate technique for inclusion in the laboratory routine. Furthermore, population data were obtained on

the estimated incidence of SMA in Rio Grande do Sul, based on the frequency of positive cases. These data can serve as a basis for planning broader studies and for the definitive implementation of newborn screening for SMA in the State of Rio Grande do Sul and in Brazil.

## **CAPÍTULO 1.**

### **INTRODUÇÃO**

#### **1.1. Atrofia Muscular Espinhal**

A Atrofia Muscular Espinhal (AME) é um distúrbio neuromuscular caracterizado pela degeneração dos neurônios motores do corno anterior da medula espinhal, levando à fraqueza muscular progressiva e atrofia. A forma clássica da doença apresenta herança autossômica recessiva, ocasionada por mutações no gene de sobrevivência do neurônio motor 1, chamado *SMN1*. É uma condição que deve ser diagnosticada na infância, pois apesar de ser rara, é a causa genética mais comum de óbito infantil (Lunn & Wang, 2008). A doença se apresenta em quatro tipos clínicos, diferenciados com base na idade de início dos sintomas e na máxima função adquirida, sendo que indivíduos com o tipo mais grave da doença podem parecer normais ao nascimento, mas nos primeiros meses de vida apresentar fraqueza muscular (Baioni & Ambiel, 2010; D'Amico *et al.*, 2011).

Os tipos clínicos são divididos em AME tipo I, II, III e IV. O tipo I (doença infantil aguda grave) apresenta início precoce dos sintomas, entre 0 a 6 meses de idade, sendo caracterizado pela falta de habilidade de sentar sem apoio e curta expectativa de vida. Já o tipo II (doença infantil crônica) tem início dos sintomas entre 6 a 18 meses de idade, de forma que os pacientes conseguem sentar sem apoio sozinhos ou, em alguns casos, somente quando posicionados. A AME tipo III (doença juvenil) se manifesta após 18 meses de idade, sendo o período de início dos sintomas variável, a capacidade de andar é preservada. Por fim, a AME tipo IV (doença adulta) é caracterizada por leve prejuízo motor, preservação da capacidade de andar e expectativa de vida normal (Baioni & Ambiel, 2010; Lunn & Wang, 2008).

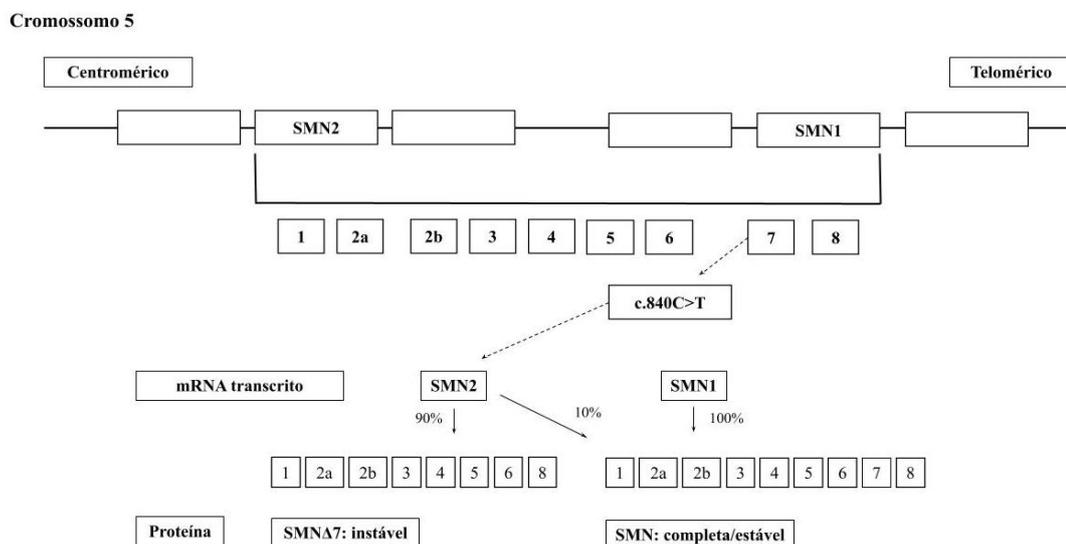
A frequência estimada de afetados pela AME é 1 em 6.000 a 1 em 10.000 nascidos vivos na população geral. Por outro lado, a frequência de indivíduos portadores saudáveis (heterozigotos), é fortemente dependente da população. Os dados obtidos por Hendrickson *et al.*, (2009), relataram que a frequência de uma cópia de *SMN1* nos EUA foi estimada em 1:37 para caucasianos, 1:46 para judeus Ashkenazi, 1:56 para asiáticos, 1:91 para afro-americanos e 1:125 para hispânicos. Em 2010, o estudo de Baioni & Ambiel relatou como 1:50 a frequência de heterozigotos na população geral (Baioni & Ambiel, 2010). Diante disso, é importante salientar que, além de ser a causa mais frequente de óbito infantil decorrente de uma condição monogênica,

é a segunda doença autossômica recessiva fatal mais comum, atrás em frequência apenas da fibrose cística (D'Amico *et al.*, 2011).

## 1.2. Aspectos Genéticos e Clínicos

O locus SMN está localizado no cromossomo 15 (5q11.2-q13.3), compreendendo 9 exons e abrangendo aproximadamente 20 kb. Este locus está constituído por dois genes altamente homólogos que fazem parte de uma grande duplicação invertida no cromossomo 15, a qual é propensa a rearranjos e deleções. O gene *SMN1* de posição telomérica e o gene *SMN2* de posição centromérica, compartilham mais de 99% da sua sequência e ambos codificam a proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), que possui 294 aminoácidos (Lefebvre *et al.*, 1995). O códon de parada para a produção da proteína SMN está no exon 7, de modo que o exon 8 não é traduzido (Burglen *et al.*, 1996).

Especificamente, a diferença entre os genes *SMN1* e *SMN2* é de apenas 11 nucleotídeos, sendo a substituição c.840C>T, que ocorre no exon 7 do gene *SMN1*, a mais importante para a compreensão da AME (Finkel *et al.*, 2017). Esta substituição ocorre em uma região chamada *exonic splicing enhancer*, que regula a inclusão do exon 7 na transcrição para o mRNA. Quando ocorre a substituição C - T, a produção do mRNA completo é prejudicada e o exon 7 não é incluído. Entretanto, o exon 7 é responsável por gerar a proteína SMN completa e funcional, então apenas 10-25% das transcrições de *SMN2* possuem o exon 7 e os outros 75-90% não possuem, dando origem a uma proteína truncada e instável (SMN $\Delta$ 7) que é rapidamente degradada. Desta forma, a ausência do gene *SMN1* pode ser causada pela deleção do exon 7 ou por conversão gênica que transforma *SMN1* em *SMN2* (Baioni & Ambiel, 2010; Vitte *et al.*, 2007).



**Figura 1** - Estrutura esquemática do locus SMN no cromossomo 5. Sinalização da diferença entre os genes *SMN1* e *SMN2*, destacando a substituição c.840C>T. Está demonstrado a transcrição do mRNA de cada um dos genes e a tradução para a proteína SMN. Adaptado de Baioni & Ambiel, 2010.

O gene *SMN2* pode ser considerado como gene inativo, atuando apenas como modificador da gravidade da doença. Para isto, é levado em conta o número de cópias intactas do gene. O aumento no número de cópias de *SMN2* acarreta na produção de uma quantidade maior da proteína SMN funcional, levando a manifestações clínicas mais leves da doença. Dito isso, o número de cópias de *SMN2* está relacionado com os fenótipos dos diferentes tipos clínicos da AME. Os pacientes com formas mais brandas apresentam um número maior de cópias deste gene e os pacientes com formas mais graves apresentam menor número de cópias. (Finkel *et al.*, 2017; Mercuri *et al.*, 2012). Deste modo, é fundamental salientar que a inexistência da proteína SMN é uma condição letal e que a AME é causada pela produção da proteína em baixos níveis, mas não por sua ausência total.

<b>Tipo Clínico</b>	<b>Número de Cópias</b>
<b>AME Tipo I</b>	1 ou 2 cópias <i>SMN2</i> – em 80% dos pacientes
<b>AME Tipo II</b>	3 cópias <i>SMN2</i> – em mais de 80% dos pacientes
<b>AME Tipo III</b>	3 ou 4 cópias de <i>SMN2</i> – em 96% dos pacientes
<b>AME Tipo IV</b>	4 ou mais cópias de <i>SMN2</i>

Na maioria dos casos de afetados pela AME ocorre deleção do exon 7 do gene *SMN1*. Destes, cerca de 90-95% dos indivíduos, comumente crianças com diagnóstico clínico dos tipos I, II e III da AME, apresentam deleção do exon 7 em ambas as cópias do *SMN1*, isto é, são homocigotos para esta deleção. Contudo, cerca de 2-5% dos indivíduos que preenchem os critérios clínicos de AME apresentam a deleção do exon 7 do *SMN1* em um único alelo, sendo necessária a busca por mutações de ponto nestes casos para a confirmação diagnóstica (Araújo *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que a perda completa de SMN é uma condição letal e que a AME é causada por baixos níveis de SMN - não sua ausência total. Por isso, não há relatos de pacientes identificados com AME que apresentem deleção de *SMN1* e *SMN2*.

### 1.3. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico da AME é baseado em testes genéticos moleculares, devido à ausência do exon 7 e, eventualmente, do exon 8 do gene *SMN1*. Os testes utilizados para o diagnóstico da condição são baseados preferencialmente em técnicas semi-quantitativas ou quantitativas, em função do número de cópias do exon 7 dos genes *SMN1* e *SMN2* ser o foco de interesse.

As técnicas semi-quantitativas, como PCR - *Single Strand Conformation polymorphism* (PCR-SSCP) e PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), apresentam sensibilidade entre 95 a 98% e especificidade de 100% (D'Amico *et al.*, 2011). Estas são capazes de detectar deleções, somente em homozigose, dos exons 7 e 8 de *SMN1*. A análise semi-quantitativa não permite a detecção de heterozigotos, ou seja, não permite detectar portadores, nem indivíduos doentes heterozigotos compostos (com a deleção comum em um dos alelos e mutação de ponto no outro).

As técnicas mais sensíveis para o diagnóstico dos pacientes com AME e que também são capazes de identificar portadores, são os métodos quantitativos, como PCR quantitativo em tempo real (qPCR em tempo real) e análise por amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Sugarman *et al.*, 2012).

Eventuais mutações de ponto podem ser identificadas por sequenciamento de Sanger ou Sequenciamento de Nova Geração, tendo sido descritas, até o momento, 112 mutações de ponto, inserções e deleções no *SMN1* (Stenson *et al.*, 2017). Entretanto, em até 1/3 dos casos com clínica sugestiva e deleção do exon 7 do *SMN1* em 1 dos alelos, a segunda mutação não é encontrada, sugerindo a possibilidade de mutações em regiões intrônicas usualmente não avaliadas (D'Amico *et al.*, 2011).

Um estudo piloto, no estado de Nova Iorque (Estados Unidos), analisou por qPCR em tempo real 3.826 nascidos vivos, num período de 1 ano. O estudo mostrou a viabilidade da triagem neonatal através da metodologia quantitativa, além da importância da inclusão de AME nos testes de triagem (Kraszewski *et al.*, 2018). Em Taiwan, a análise quantitativa também foi utilizada para triar 120.000 nascidos, durante 1 ano e 10 meses. O estudo evidencia a importância de uma triagem

para identificar pacientes precocemente e assim iniciar o tratamento, antes mesmo do aparecimento dos sintomas (Chien *et al.*, 2017).

A tecnologia do qPCR em tempo real possibilita a quantificação dos produtos de amplificação em “tempo real”, de modo que a quantidade de amplicons gerados seja mensurada através da intensidade de fluorescência emitida pela sonda que hibridiza com a sequência. Para isto, é utilizado um termociclador capaz de detectar a fluorescência gerada pelas moléculas fluorescentes (sondas) que são incluídas nos reagentes de preparo da PCR. Desta forma, a intensidade da fluorescência emitida é computada pelo equipamento e interpretada como resultado (Chiang *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996; Syvänen *et al.*, 1998). O momento da reação em que a intensidade da fluorescência atinge o limiar de detecção é conhecido como *Threshold Cycle* (Ct). Logo, o *threshold* é definido como o número de ciclos necessários (Ct), durante a fase exponencial da curva de amplificação, para que a fluorescência emitida pela sequência de interesse ultrapasse o sinal de *background*, sendo este valor proporcional à quantidade de produto produzido pelas amostras.

Considerando as abordagens de interpretação de resultados da qPCR em tempo real, temos a curva de dissociação, conhecida como curva de *melting*. Esta abordagem é baseada na diferença de temperatura em que ocorre a dissociação da sonda fluorescente hibridizada ao amplicon. Após a amplificação da sequência de interesse na PCR, ocorre a hibridização da sonda aos amplicons. Então, a fluorescência da sonda é medida após a hibridização, quando ocorre um aumento gradativo da temperatura da reação, durante a geração de uma curva de *melting*. No âmbito da AME, a região amplificada constitui uma parte do exon 7 que inclui a substituição c.840C>A. Desta forma, para obter o diagnóstico molecular, a diferença entre *SMN1* e *SMN2* é identificada devido a uma diferença de temperatura na geração da curva de *melting*. Esta diferença é produzida pela substituição que ocorre no exon 7, fazendo com que a hibridização aos amplicons do *SMN2* não seja perfeita e apresente menor temperatura de dissociação (Strunk *et al.*, 2019). A ausência de um pico de temperatura específico para *SMN1* demonstra deleção do exon 7, indicando para diagnóstico da AME.

#### **1.4. Tratamento**

A disponibilidade do primeiro medicamento capaz de modificar o curso da AME é consideravelmente recente. O medicamento Nusinersena (Spiranza) foi aprovado pela agência regulatória dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da

doença em dezembro de 2016. Durante o ano seguinte, o uso do medicamento para a condição também foi aprovado pela agência regulatória europeia, *European Medicines Agency* (EMA) e pela agência regulatória brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O medicamento é um oligonucleotídeo antissenso (ASO) que atua se ligando ao mRNA transcrito pelo gene *SMN2* e impede a exclusão do exon 7. Em outras palavras, o ASO altera o splicing do pré-mRNA, incluindo o exon 7 na transcrição e acarretando em aumento da produção da proteína SMN funcional (Finkel *et al.*, 2017).

O surgimento desta terapia, associado às evidências de maior eficácia nos estudos em fase pré-sintomática da condição, argumentam em favor do início do tratamento o mais precocemente possível (Talbot & Tizzano, 2017; de Vivo *et al.*, 2019). É importante considerar a janela terapêutica para um potencial benefício, uma vez que na AME tipo I ocorre uma rápida perda dos motoneurônios já nos primeiros 3 meses de vida e perda predominante das unidades motoras aos 6 meses (Prior, 2010). Estes dados dão indício da necessidade de tratamentos em fases precoces ou mesmo pré-sintomáticas da condição (compatível com a ideia de que todos os indivíduos afetados terão algum grau de perda irreversível dos motoneurônios no momento do diagnóstico clínico).

Os avanços no entendimento molecular desta condição e a evolução das técnicas de genética e biologia molecular culminaram para o desenvolvimento de medicamentos, capazes de modificar ou modular a sequência e a transcrição do DNA. Além do Nusinersena, outras terapias estão disponíveis e aprovadas para uso no Brasil. Em agosto de 2020, foi aprovado pela ANVISA o medicamento baseado em terapia gênica, Zolgensma (onasemnogeno abeparvoveque), para tratamento da AME. Mais adiante, em outubro de 2020, o medicamento Risdiplam (Evrysdi) também foi aprovado para tratamento da condição no nosso país. Ademais, existem outros fármacos em fase de estudos clínicos que promovem o splicing alternativo do gene *SMN2* para produção da SMN funcional.

### **1.5. Triagem Neonatal**

O uso de testes de triagem neonatal está amplamente difundido, bem como preconizado pelos órgãos regulamentadores e desempenha um importante papel na prevenção da mortalidade e morbidade em recém-nascidos de todas as classes sociais do país. A triagem neonatal tem como objetivo principal identificar precocemente os indivíduos afetados por doenças tratáveis, nas quais o benefício do tratamento é maior quando iniciado em fase pré-clínica. A fenilcetonúria foi o

primeiro distúrbio genético-metabólico rastreado em recém-nascidos, baseado no método microbiológico aplicável em larga escala desenvolvido pelo Dr. Robert Guthrie em 1963, a partir de gotas de sangue obtidas do calcanhar dos bebês e impregnadas em papel filtro (SIPF). A partir deste programa inicial, desenvolveu-se progressivamente um amplo esquema de rastreamento para muitas doenças adicionais, visando a identificação de um número crescente de condições para as quais a intervenção precoce seja capaz de prevenir a mortalidade prematura, morbidade e deficiências associadas. (Guthrie & Susi, 1963; Wilson & Jungner, 1968).

Atualmente, a triagem neonatal é a iniciativa de saúde pública e de pediatria preventiva, ligada à genética, mais conhecida e utilizada no mundo. No Brasil, o reconhecimento da triagem neonatal como um programa específico de saúde pública aconteceu em 2001, com a criação do PNTN, coordenado pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 1992; Ministério da Saúde, 2001). O PNTN é reconhecidamente um programa de saúde pública bem-sucedido, realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (de Carvalho *et al.*, 2007). Recentemente, em 26 de maio de 2021, a Lei nº 14.154 foi aprovada para o aperfeiçoamento do PNTN. A proposta consiste na ampliação das doenças a serem rastreadas pelo teste do pezinho, englobando 14 grupos de doenças a serem incluídas, de forma escalonada, divididas em cinco etapas (Ministério da Saúde, 2021). A AME está prevista para inclusão na expansão na quinta etapa.

Apesar de inovadora, a reforma no PNTN no Brasil segue normativas já implementadas em outros países. Em 2006, o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), publicou um relatório recomendando que todo recém-nascido nos Estados Unidos deveria ser rastreado para pelo menos 29 condições essenciais adicionadas no RUSP (*Recommended Uniform Screening Panel*), uma lista de distúrbios para inclusão nos painéis de triagem neonatal de todos os estados americanos (Watson *et al.*, 2006).

No Brasil, o diagnóstico das doenças triadas pelo teste do pezinho é realizado utilizando testes bioquímicos. No entanto, um grande número de condições de manifestação na infância decorre de mutações em genes codificadores de componentes celulares não-enzimáticos e que não podem ser identificados utilizando tais métodos. A AME está entre estas condições, não havendo um marcador bioquímico específico que possa ser detectado por técnicas de triagem bioquímica, de modo que o diagnóstico recairá em análises moleculares.

Adicionalmente, em janeiro de 2022, o medicamento Nusinersena foi aprovado pelo Ministério da Saúde como tratamento para AME tipo I e II no âmbito do SUS, passando a fazer parte dos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da AME. Neste cenário, novos

desafios estão sendo encontrados para o estabelecimento das metodologias que serão utilizadas, considerando a disponibilidade de novas técnicas, mais modernas, sensíveis e robustas, para a cobertura de todas as condições triadas. Da mesma forma, o conhecimento sobre a frequência de afetados na população é importante não apenas para questões de aconselhamento genético, mas também para ser possível calcular uma previsão da prevalência ou incidência destas condições, sem os vieses de estudos de prevalência baseados em amostras de centros de referência terciários ou quaternários. Uma série de questões éticas e econômicas surgiram com a aprovação do tratamento, que se mostra eficaz pelo menos em fases iniciais da doença, e que possui custos altos, em especial considerando a frequência estimada entre 1:6.000 a 1:10.000 de nascidos vivos para AME.

Considerando os dados preliminares de 2021 disponíveis no DATASUS o número de nascidos vivos no Brasil foi 2.671.947, sendo 124.420 nascidos vivos no Estado do Rio Grande do Sul. Utilizando uma incidência de 1:8.000 nascidos vivos, seria esperado o nascimento de 333 crianças com AME no Brasil e 15 crianças com AME no Rio Grande do Sul por ano. Tais dados de incidência da doença no Brasil não são acurados. Devido ao alto custo do medicamento e ao formato do sistema de saúde brasileiro de acesso universal e integral, os gastos com o tratamento desta doença rara serão consideráveis nos próximos anos e é necessário haver um planejamento nacional específico para tratamentos de altíssimo custo que envolva doenças raras, com a necessidade de dados acurados nacionais e regionais sobre estas condições, a fim de avaliar o impacto orçamentário real, bem como a fim de possibilitar o acesso ao tratamento para a maioria dos indivíduos. Neste sentido, a ciência precisa colaborar fornecendo as evidências necessárias para a adoção de medidas que garantam a ampliação dos painéis de forma prática e efetiva.

## **CAPÍTULO 2.**

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Analisar através de PCR quantitativo em tempo real, utilizando a metodologia *SALSA® MC002 SMA Newborn Screen*, amostras de recém-nascidos do estado do Rio Grande do Sul no período de oito meses, com a finalidade de validação da metodologia e vistas à implementação do teste para triagem neonatal de Atrofia Muscular Espinhal no Brasil.

#### **Objetivos Específicos**

-Validar a metodologia *SALSA® MC002 SMA Newborn Screen* através de qPCR em tempo real como teste para triagem neonatal de Atrofia Muscular Espinhal (*first-tier test*);

-Confirmar os resultados positivos provenientes do qPCR em tempo real através de MLPA aplicando a metodologia *SALSA® MLPA® Probemix P060 SMA* (*second-tier test*);

-Estimar a incidência de AME no estado do Rio Grande do Sul com base na frequência de resultados positivos;

-Fornecer dados que sirvam de subsídio para planejamento de políticas públicas relacionadas à dispensação de medicamentos de alto custo para AME;

-Fornecer informações que possam auxiliar na tomada de decisão sobre implementação de testes de triagem neonatal para AME pelas autoridades e sociedades competentes.

### CAPÍTULO 3.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho se propôs a analisar amostras de recém-nascidos do estado do Rio Grande do Sul, no período de oito meses, para validar um teste de triagem neonatal para Atrofia Muscular Espinhal, a partir de qPCR em tempo real utilizando a metodologia *SALSA® MC002 SMA Newborn Screen*.

Para isto foi realizada a validação da metodologia empregando 25.000 amostras de recém-nascidos encaminhadas pelo SRTN/RS, provenientes do teste do pezinho. Logo, verificou-se a efetividade da validação do teste de triagem (*first-tier test*), sendo possível detectar 3 casos efetivamente positivos para AME e 24.997 casos negativos. Após, foi realizada análise confirmatória através de MLPA (*second-tier test*) para amostras com resultados positivos ou suspeitos na triagem inicial. A técnica de MLPA é considerada padrão-ouro para diagnóstico da AME, através da qual foi possível determinar o tipo clínico dos 3 pacientes afetados e eliminar 1 resultado falso-positivo obtido na triagem inicial (Arkblad *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017; Varga *et al.*, 2012). Portanto, este fluxo permitiu concluir que a metodologia *SALSA® MC002 SMA Newborn Screen* é apropriada para diagnóstico da AME utilizando amostras do teste do pezinho, sendo uma técnica adequada para inclusão na rotina laboratorial com aplicação à triagem neonatal. Ainda, foi possível obter dados populacionais sobre a incidência estimada de AME no RS, chegando a uma incidência de 1 em 8.333 nascidos-vivos.

Em virtude do que foi observado nos resultados, agregado ao fato de que a AME é a causa mais frequente de óbito infantil decorrente de uma condição monogênica e a segunda doença autossômica recessiva fatal mais comum, com incidência mundial estimada de 1 em 10.000 nascidos vivos (D'Amico *et al.*, 2011), fica clara a relevância desta pesquisa e das inúmeras aplicações que as informações obtidas podem ter.

Em dezembro de 2016 foi aprovado o primeiro tratamento capaz de modificar a história natural da AME, o medicamento Nusinersena, que se mostrou mais eficaz quando administrado em fases iniciais da doença (Finkel *et al.*, 2017). Visto que a medição possui custos altos, uma série de questões éticas e econômicas surgiram desde a aprovação pelas agências reguladoras. Associado às evidências de maior eficácia desta terapia nos estudos em fase pré-sintomática da condição (compatível com a ideia de que todos os indivíduos afetados terão algum grau de perda irreversível dos motoneurônios no momento do diagnóstico clínico), os fatos argumentaram a

favor do início do tratamento o mais precocemente possível (Talbot & Tizzano, 2017). Neste cenário, a triagem neonatal para a AME passou a ser recomendada e inclusive já iniciada em diferentes países (Boemer *et al.*, 2021; D'Silva *et al.*, 2022; Kernohan *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Sawada *et al.*, 2022).

No contexto do nosso país, em maio de 2021 foi aprovada a Lei nº 14.154 para o aperfeiçoamento do PNTN, que consiste na ampliação das doenças rastreadas pelo teste do pezinho (Ministério da Saúde, 2021). Assim sendo, a inclusão da AME está prevista para a quinta etapa da expansão. Adicionalmente, em janeiro de 2022, o medicamento Nusinersena foi aprovado pelo Ministério da Saúde como tratamento para AME tipo I e II no âmbito do SUS, passando a fazer parte do PCDT da AME no Brasil. Desta forma, o conhecimento sobre a frequência de afetados na população brasileira é importante para possibilitar o cálculo de uma previsão da prevalência ou incidência desta condição, sem os vieses de estudos de prevalência baseados em amostras de centros de referência terciários ou quaternários.

De acordo com a incidência estimada obtida no estudo de 1 em 8.333 nascidos-vivos, aparentemente o Brasil, representado pelo estado do Rio Grande do Sul, apresenta maior incidência quando comparado aos dados de outros países (Boemer *et al.*, 2021; Chein *et al.*, 2017; Kariyawasam *et al.*, 2020; Kernohan *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2022; Matteson *et al.*, 2022; Sawada *et al.*, 2022;). Devido ao alto custo do medicamento Nusinersena e o formato do sistema de saúde brasileiro de acesso universal e integral, os gastos com o tratamento desta doença serão consideráveis nos próximos anos. É necessário haver um planejamento nacional específico para tratamentos de altíssimo custo, com a demanda de dados nacionais e regionais acurados, a fim de avaliar o impacto orçamentário real, bem como a fim de possibilitar o acesso ao tratamento para a maioria dos indivíduos.

O aperfeiçoamento da política do PNTN com a aprovação da Lei nº 14.154, representa um imenso avanço no painel de condições a serem avaliadas na triagem neonatal. Entretanto, o cronograma de implementação e os recursos necessários, ainda não foram definidos pelo Ministério da Saúde. Visto que os Estados possuem prazo de 4 anos para inclusão das 50 doenças nos programas de triagem, novos desafios estão sendo encontrados para o estabelecimento das metodologias que serão utilizadas, considerando a disponibilidade de novas técnicas, mais modernas, sensíveis e robustas, para a cobertura de todas as condições triadas. Neste sentido, a ciência precisa colaborar fornecendo as evidências necessárias para a adoção de medidas que garantam a ampliação dos painéis de forma prática e efetiva.

Uma vez que este trabalho faz parte de um estudo multicêntrico, que já está sendo realizado em outro SRTN, os aprendizados obtidos aqui são de extremo valor. Logo, cabe mencionar a necessidade da disponibilização de treinamento aos profissionais das Unidades de Saúde onde são realizadas as coletas do teste do pezinho, com a finalidade de aumentar a aderência da população nos projetos de pesquisa, bem como para incentivar a coleta adequada das amostras de SIPF. Além disso, relatar o intervalo temporal que existe entre a coleta da amostra e a obtenção do diagnóstico através da pesquisa, o que pode ser um problema para o início do tratamento da AME ainda em fase pré-sintomática. Por fim, como já mencionado, a metodologia *SALSA@MC002 SMA Newborn Screen*, utilizada neste trabalho, se mostrou adequada para aplicação na triagem neonatal. Desta forma, estes resultados e aprendizados serão considerados na expansão deste estudo para outros centros e Estados, já prevista para o ano de 2023, almejando a obtenção de dados ainda mais robustos sobre a AME no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- Araújo, A. P., Ramos, V. G., & Cabello, P. H. (2005). Dificuldades diagnósticas na atrofia muscular espinhal [Diagnostic difficulties in spinal muscular atrophy]. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 63(1), 145–149.
- Arkblad, E. L., Darin, N., Berg, K., Kimber, E., Brandberg, G., Lindberg, C., Holmberg, E., Tulinius, M., & Nordling, M. (2006). Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscular disorders: NMD*, 16(12), 830–838.
- Baioni, M. T., & Ambiel, C. R. (2010). Spinal muscular atrophy: diagnosis, treatment and future prospects. *Jornal de pediatria*, 86(4), 261–270.
- Bürglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C., Munnich, A., & Melki, J. (1996). Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*, 32(3), 479–482.
- Boemer, F., Caberg, J. H., Beckers, P., Dideberg, V., di Fiore, S., Bours, V., Marie, S., Dewulf, J., Marcelis, L., Deconinck, N., Daron, A., Blasco-Perez, L., Tizzano, E., Hilgsmann, M., Lombet, J., Pereira, T., Lopez-Granados, L., Shalchian-Tehran, S., van Assche, V., Willems, A., ... Servais, L. (2021). Three years pilot of spinal muscular atrophy newborn screening turned into official program in Southern Belgium. *Scientific reports*, 11(1), 19922.
- de Carvalho, T. M., dos Santos, H. P., dos Santos, I. C., Vargas, P. R., & Pedrosa, J. (2007). Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *Journal of inherited metabolic disease*, 30(4), 615.
- Chiang, P. W., Song, W. J., Wu, K. Y., Korenberg, J. R., Fogel, E. J., Van Keuren, M. L., Lashkari, D., & Kurnit, D. M. (1996). Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome research*, 6(10), 1013–1026.
- Chien, Y. H., Chiang, S. C., Weng, W. C., Lee, N. C., Lin, C. J., Hsieh, W. S., Lee, W. T., Jong, Y. J., Ko, T. M., & Hwu, W. L. (2017). Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *The Journal of pediatrics*, 190, 124–129.e1.
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F. D., & Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet journal of rare diseases*, 6, 71.
- D'Silva, A. M., Kariyawasam, D. S. T., Best, S., Wiley, V., Farrar, M. A., & NSW SMA NBS Study Group (2022). Integrating newborn screening for spinal muscular atrophy into health care systems: an Australian pilot programme. *Developmental medicine and child neurology*, 64(5), 625–632.

- Finkel, R. S., Sejersen, T., Mercuri, E., & ENMC SMA Workshop Study Group (2017). 218th ENMC International Workshop: Revisiting the consensus on standards of care in SMA Naarden, The Netherlands, 19-21 February 2016. *Neuromuscular disorders: NMD*, 27(6), 596–605.
- Guthrie, R., & Susi, A. (1963). A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics*, 32, 338–343.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986–994.
- Hendrickson, B. C., Donohoe, C., Akmaev, V. R., Sugarman, E. A., Labrousse, P., Boguslavskiy, L., Flynn, K., Rohlf, E. M., Walker, A., Allitto, B., Sears, C., & Scholl, T. (2009). Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *Journal of medical genetics*, 46(9), 641–644.
- Kariyawasam, D. S. T., Russell, J. S., Wiley, V., Alexander, I. E., & Farrar, M. A. (2020). The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(3), 557–565.
- Kraszewski, J. N., Kay, D. M., Stevens, C. F., Koval, C., Haser, B., Ortiz, V., Albertorio, A., Cohen, L. L., Jain, R., Andrew, S. P., Young, S. D., LaMarca, N. M., De Vivo, D. C., Caggana, M., & Chung, W. K. (2018). Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 20(6), 608–613.
- Kernohan, K. D., McMillan, H. J., Yeh, E., Lalaria, M., Kowalski, M., Campbell, C., Dowling, J. J., Gonorazky, H., Marcadier, J., Tarnopolsky, M. A., Vajsar, J., Mackenzie, A., & Chakraborty, P. (2022). Ontario Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy: The First Year. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 49(6), 821–823.
- Lee, B. H., Deng, S., Chiriboga, C. A., Kay, D. M., Irumudomon, O., Laureta, E., Delfiner, L., Treidler, S. O., Anziska, Y., Sakonju, A., Kois, C., Farooq, O., Engelstad, K., Laurenzano, A., Hogan, K., Caggana, M., Saavedra-Matiz, C. A., Stevens, C. F., & Ciafaloni, E. (2022). Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy in New York State: Clinical Outcomes From the First 3 Years. *Neurology*, 99(14), e1527–e1537. Advance online publication.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., & Zeviani, M. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), 155–165.
- Li, L., Zhou, W. J., Fang, P., Zhong, Z. Y., Xie, J. S., Yan, T. Z., Zeng, J., Tan, X. H., & Xu, X. M. (2017). Evaluation and comparison of three assays for molecular detection of spinal muscular atrophy. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 55(3), 358–367.

Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet* (London, England), 371(9630), 2120–2133.

Matteson, J., Wu, C. H., Mathur, D., Tang, H., Sciortino, S., Feuchtbaum, L., Bishop, T., Sharma, S. C., Neogi, P., Fitzgibbon, I., & Olney, R. S. (2022). California's experience with SMA newborn screening: A successful path to early intervention. *Journal of neuromuscular diseases*, 9(6), 777–785.

Mercuri, E., Bertini, E., & Iannaccone, S. T. (2012). Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *The Lancet. Neurology*, 11(5), 443–452.

Ministério da Saúde. (1992). Portaria GM/MS nº22 de 15 de janeiro de 1992 - Programa de Diagnóstico Precoce do Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria. *Diário Oficial da União*.

Ministério da Saúde. (2001). Portaria GM/MS nº 822 de 06 de junho de 2001 - Programa Nacional de Triagem Neonatal. *Diário Oficial da União*.

Ministério da Saúde. (2021). Lei nº 14.154, de 26 de maio de 2021, para aperfeiçoamento do Programa Nacional de Triagem Neonatal. *Estatuto da Criança e do Adolescente, Diário Oficial da União*

Prior, T. W., Snyder, P. J., Rink, B. D., Pearl, D. K., Pyatt, R. E., Mihal, D. C., Conlan, T., Schmalz, B., Montgomery, L., Ziegler, K., Noonan, C., Hashimoto, S., & Garner, S. (2010). Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *American journal of medical genetics. Part A*, 152A(7), 1608–1616.

Sawada, T., Kido, J., Sugawara, K., Yoshida, S., Ozasa, S., Nomura, K., Okada, K., Fujiyama, N., & Nakamura, K. (2022). Newborn screening for spinal muscular atrophy in Japan: One year of experience. *Molecular genetics and metabolism reports*, 32, 100908.

Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human genetics*, 136(6), 665–677.

Strunk A, Abbes A, Stuitje AR, Hettinga C, Sepers EM, Snetselaar R, Schouten J, Asselman FL, Cuppen I, Lemmink H, et al (2019) Validation of a Fast, Robust, Inexpensive, Two-Tiered Neonatal Screening Test algorithm on Dried Blood Spots for Spinal Muscular Atrophy. *Int J Neonatal Screen*. 5(2):21.

Sugarman, E. A., Nagan, N., Zhu, H., Akmaev, V. R., Zhou, Z., Rohlf, E. M., Flynn, K., Hendrickson, B. C., Scholl, T., Sirko-Osada, D. A., & Allitto, B. A. (2012). Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *European journal of human genetics: EJHG*, 20(1), 27–32.

Syvänen, A. C., Bengtström, M., Tenhunen, J., & Söderlund, H. (1988). Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic acids research*, 16(23), 11327–11338.

Talbot, K., & Tizzano, E. F. (2017). The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. *Gene therapy*, 24(9), 529–533.

Varga, R. E., Mumtaz, R., Jahic, A., Rudenskaya, G. E., Sánchez-Ferrero, E., Auer-Grumbach, M., Hübner, C. A., & Beetz, C. (2012). MLPA-based evidence for sequence gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. *Analytical biochemistry*, 421(2), 799–801.

Vitte, J., Fassier, C., Tiziano, F. D., Dalard, C., Soave, S., Roblot, N., Brahe, C., Saugier-veber, P., Bonnefont, J. P., & Melki, J. (2007). Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *The American journal of pathology*, 171(4), 1269–1280.

Watson, M. S., Mann, M. Y., Lloyd-Puryear, M. A., Rinaldo, P. & Howell, R. (2006). Newborn screening: toward a uniform screening panel and system--executive summary. *Pediatrics*, 117(5 Pt 2), S296–S307.

Wilson, J. M., & Jungner, Y. G. (1968). Principios y métodos del examen colectivo para identificar enfermedades [Principles and practice of mass screening for disease]. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Pan American Sanitary Bureau*, 65(4), 281–393.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Termo de Recusa

#### **Teste Opcional e Gratuito - Triagem Neonatal para Atrofia Muscular Espinhal**

#### **LER COM ATENÇÃO - INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE O TESTE DO PEZINHO**

(os pais podem não concordar com o teste adicional, basta assinalar abaixo)

**O que é a triagem neonatal?** A triagem neonatal (ou teste do pezinho) é um exame realizado nos bebês logo após o seu nascimento para protegê-los de danos irreversíveis relacionados à doenças que podem ser tratadas, mas que usualmente não são diagnosticadas antes de vários dias, vários meses ou até mesmo vários anos de vida.

**Porque os bebês fazem triagem neonatal?** As doenças pesquisadas são raras, mas podem resultar em sérios problemas de saúde, que podem ser evitados ou minimizados se forem detectados precocemente. A triagem neonatal auxilia na identificação dos bebês que têm uma dessas doenças enquanto são ainda assintomáticos (sem sintomas). O tratamento precoce irá auxiliar seu bebê a crescer o mais saudável possível.

**O que é Atrofia Muscular Espinhal?** A atrofia muscular espinhal (AME) é uma da doença caracterizada pela degeneração dos neurônios motores da medula espinhal, causando fraqueza progressiva dos membros e tronco, seguida de atrofia muscular.

**Existe cura para essa doença?** Até o presente momento não existe cura para Atrofia Muscular Espinhal. No entanto, se o diagnóstico precoce é realizado o bebê pode receber tratamento o quanto antes, e dessa forma sérios problemas podem ser prevenidos ou reduzidos.

**Como é o tratamento?** O Ministério da Saúde dispõe de um “Protocolo Clínico e Diretrizes e Terapêuticas (PCDT)” para pacientes com AME publicado no Diário Oficial da União em 22 de outubro de 2019. Segundo este protocolo, fica incorporado o tratamento medicamentoso no âmbito do SUS para pacientes com AME tipo 1 (início dos sintomas até 6 meses de vida) e também para portadores pré-sintomáticos da mutação causadora da AME (até 3 cópias do gene SMN2).

**Como este teste será realizado?** O teste será realizado na mesma amostra coletada para o teste do pezinho convencional. Se o teste resultar positivo ou duvidoso, os pais serão contatados com vistas à realização de exames adicionais para esclarecer o caso. Se confirmado o diagnóstico, seu bebê será encaminhado a um serviço que possa proporcionar o atendimento previsto pelo SUS

para esses casos, de acordo com o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas” em vigor, aprovado pelo Ministério da Saúde.

**ATENÇÃO:** Este teste para AME está sendo realizado dentro de um projeto-piloto, é um teste opcional, sem custo nenhum para os participantes. Nos casos em que os testes tiverem alguma alteração, os pais serão contatados pela equipe do projeto para a realização de testes confirmatórios (também sem custos para os participantes) visando ao completo esclarecimento da situação. Esses exames adicionais somente serão realizados se os pais concordarem.

Não concordo em participar da “Triagem Neonatal para AME” e somente autorizo a realização dos exames do teste do pezinho convencional.

\_\_\_\_\_  
Nome do recém-nascido

\_\_\_\_\_  
Data de nascimento

\_\_\_\_\_  
Nome do representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do representante legal

**OBS: Se os pais não concordarem com a realização do teste para AME, anexar esta ficha preenchida e assinada ao cartão com a amostra do bebê (nesse caso, a teste do pezinho convencional será realizado normalmente, mas o teste para AME não será realizado)**

## **Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Recoleta)**

Título do Projeto: TRIAGEM DE RECÉM-NASCIDOS PARA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL: UM ESTUDO PILOTO NO BRASIL (PROJETO CAEE 41738220.4.1001.5327 / GPPG HCPA 2020-0705)

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar da segunda etapa de uma pesquisa porque já foi coletada uma amostra de sangue em papel filtro no momento do teste do pezinho e é necessário repetir o teste relacionado a essa pesquisa. O objetivo da pesquisa é avaliar a possibilidade de ampliar o teste do pezinho para incluir uma nova doença, a Atrofia Muscular Espinhal (AME). Esta pesquisa está sendo realizada pelos Serviços de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Universidade de Campinas (UNICAMP).

O teste do pezinho habitual rastreia um número específico de doenças, que não abrange todas as possibilidades de doenças possíveis de ocorrer em um recém-nascido. Nessa pesquisa, nosso objetivo é avaliar uma doença específica, chamada Atrofia Muscular Espinhal (AME). Esta é uma doença genética (causada por alterações no DNA) devido à deficiência de proteínas específicas causando fraqueza progressiva dos membros e tronco, seguida de atrofia muscular.

Neste estudo estamos avaliando a presença dos tipos de Atrofia Muscular Espinhal. De maneira geral, essa doença é rara, não tem cura, mas possui tratamento específico. Atualmente, não sabemos o quanto ela ocorre na nossa população. Mas é sabido que se identificada precocemente, permite que o bebê seja tratado o quanto antes, prevenindo ou reduzindo os danos da doença.

Se você concordar com a participação nessa segunda etapa da pesquisa será solicitada uma amostra de sangue do seu filho (a) (4 mL, equivalente a uma colher de chá) para avaliar se existe alguma alteração e complementar a análise no exame do seu filho (a). Se a suspeita for confirmada, você será contatado por um especialista da nossa equipe para comunicação do resultado e orientações para seu filho (a) e sua família.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

( ) Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

( ) Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são similares aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina – manchas roxas e dor no local da coleta, que serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Estas novas coletas poderão gerar ansiedade em função do procedimento e das incertezas sobre o resultado, o que será minimizado pela condução desse processo por profissional treinado e pelo rápido processamento das análises.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o reconhecimento da doença em fase inicial, abreviando o processo diagnóstico em meses ou anos, e do paciente e sua família se beneficiarem da introdução precoce das medidas de manejo e prevenção disponíveis para cada situação.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber no Hospital.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação [ex: despesas de transporte e alimentação em caso de necessidade de coleta de novas amostras e/ou de entrevistas para comunicação de resultados e orientação], cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável [Roberto Giugliani], pelo telefone (051) 3359-6338, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do recém-nascido

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
que aplicou o termo

\_\_\_\_\_  
Data

### Anexo 3 - Carta de aprovação do projeto no Hospital de Clínicas de Porto Alegre



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

**Projeto**

2020/0705

**Pesquisadores:**

ROBERTO GIUGLIANI

LARISSA POZZEBON DA SILVA

ALICE BRINCKMANN OLIVEIRA  
NETTO

MARCONDES CAVALCANTE  
FRANÇA JUNIOR

**Número de Participantes:** 0

**Título:** TRIAGEM DE RECÉM-NASCIDOS PARA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL E MLPA: UM ESTUDO PILOTO NO BRASIL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

18/08/2021



Assinado digitalmente por:  
**PATRICIA ASHTON PROLLA**  
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação  
18/08/2021 14:03:29  
https://registro.sistema.hcpa.edu.br/registro/assinatura/confirmacao/assinatura/assinatura