

**TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA**

**CONTRIBUIÇÕES PARA O ESTABELECIMENTO DE ESTRATÉGIAS  
LABORATORIAIS EM GENÉTICA PARA A SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL  
UTILIZANDO A SÍNDROME DE DELEÇÃO 22q11.2 COMO MODELO**

**Campinas**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**CONTRIBUIÇÕES PARA O ESTABELECIMENTO DE ESTRATÉGIAS  
LABORATORIAIS EM GENÉTICA PARA A SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL  
UTILIZANDO A SÍNDROME DE DELEÇÃO 22q11.2 COMO MODELO**

**Társis Antonio Paiva Vieira**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação da Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes.

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

V673c      Vieira, Társis Antonio Paiva, 1981 -  
Contribuições para o estabelecimento de estratégias  
laboratoriais em genética para a saúde pública no Brasil  
utilizando a síndrome de deleção 22q11.2 como modelo /  
Társis Antonio Paiva Vieira. -- Campinas, SP : [s.n.],  
2012.

Orientador : Vera Lucia Gil da Silva Lopes.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genética médica. 2. Saúde pública. 3.  
Diagnóstico laboratorial. 4. Síndrome de DiGeorge. 5.  
Fissura palatina. I. Lopes, Vera Lucia Gil da Silva. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Contributions to the establishment of laboratory strategies in medical genetics to the public health in Brazil, using the 22q11.2 deletion syndrome as a model.

**Palavras-chave em inglês:**

Medical genetics

Public health

Laboratory diagnosis

DiGeorge syndrome

Cleft palate

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutor em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Vera Lucia Gil da Silva Lopes [Orientador]

Marcial Francis Galera

Chong Ae Kim

Andréa Trevas Maciel Guerra

Maria de Lurdes Zanolli

**Data da defesa:** 24-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

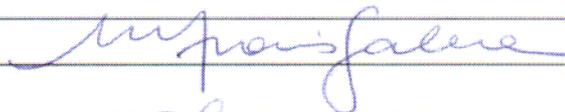
## Banca examinadora de Tese de Doutorado

Társis Antonio Paiva Vieira

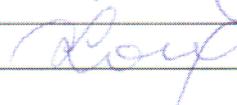
Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

### Membros:

Professor (a) Doutor (a) Marcial Francis Galera



Professor (a) Doutor (a) Chong Ae Kim



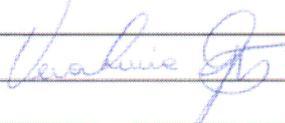
Professor (a) Doutor (a) Andréa Trevas Maciel Guerra



Professor (a) Doutor (a) Maria de Lurdes Zanolli



Professor (a) Doutor (a) Vera Lúcia Gil da Silva Lopes



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2012



*Dedico este trabalho à minha família, minha avó Nelly (in memoriam), meus pais Antonio Carlos e Nidia, e meu irmão Saulo. Muito obrigado pelo apoio e incentivo que me proporcionaram.*



## **Agradecimentos**

A minha família, pela compreensão e pelo apoio durante todo o tempo em que estive trabalhando.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, pelo constante aprendizado, pela atenção, paciência e dedicação com que me orientou durante esses anos.

A todos os amigos que estiveram sempre presentes, por todos os bons momentos compartilhados. Especialmente, Virgílio, Ilária, Bibiana, Érika, Daniel, Karina, Luciana, Milena, Carolina, Fabíola, Aline e Ana Paula.

A todos os professores, funcionários, alunos e estagiários do Departamento de Genética Médica, pelo aprendizado e ajuda nestes anos.

A todos os geneticistas clínicos que contribuíram com este trabalho, Têmis Felix, Rômulo Moubarch, Josiane de Souza, Agnes Conte, Gabriela Leal, Erlane Ribeiro, Isabella Monlleó, Marshall Fontes, Chong Kim, Fabíola Monteiro, Fabíola Vicente, Joana Prota, Carlos Steiner e Pricila Bernardi.

Aos membros da banca examinadora da tese, Prof. Francis Galera, Profa. Chong Ae Kim, Profa. Débora Gusmão, Profa. Ana Beatriz Alvarez Perez, Profa. Maria de Lurdes Zanolli, Profa. Andréa Maciel Guerra, Prof. Luiz Alberto Magna, Prof. Fábio Rossi Torres, Prof. Carlos Steiner.

Aos pacientes e suas famílias, por consentirem em suas participações neste estudo.

A FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.



1. Introdução.....	29
2. Revisão da literatura	
2.1 Aspectos do acesso aos serviços de saúde no Brasil.....	32
2.2 Genética humana e médica no Brasil .....	34
2.3 Anomalias craniofaciais e o Projeto Crânio-Face Brasil .....	38
2.4 Síndrome de deleção 22q11.2 .....	42
2.5 Diagnóstico laboratorial da deleção 22q11.2 .....	46
3. Objetivos	
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4. Casuística e Métodos	
4.1 Casuística .....	57
4.2 Métodos	
4.2.1 Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para SVCF nas instituições participantes deste trabalho.....	61
4.2.2 Exames laboratoriais .....	61

4.2.3 Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11 .....	67
4.2.4 Cálculo de custos.....	69
4.2.5 Comparação das técnicas utilizadas e avaliação de funcionamento do centro de investigação laboratorial .....	70
<b>5. Resultados</b>	
5.1 Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para SVCF nas instituições participantes deste trabalho.....	75
5.2 Exames laboratoriais	
5.2.1. Cariótipo.....	80
5.2.1.1. Anomalias cromossômicas detectadas pelo exame de cariótipo.....	81
5.2.2. Triagem de microdeleção em 22q11 .....	83
5.3 Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11.2 .....	90
5.4 Cálculo de custos.....	96
5.5 Comparação das técnicas utilizadas e recebimento de amostras para investigação.....	97
<b>6. Discussão.....</b>	<b>103</b>

6.1. Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2 nas instituições participantes deste trabalho .....	105
6.2. Exames laboratoriais .....	115
6.3. Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção .....	120
6.4. Cálculo de custos.....	122
6.5. Comparação das técnicas utilizadas e recebimento de amostras para investigação.....	124
7. Conclusões .....	133
8. Sugestões.....	134
9. Referências bibliográficas .....	139
10. Anexos	
Anexo 1: <i>Checklist</i> para S. Del 22q11.2 .....	149
Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	156
Anexo 3: TCLE .....	157
11. Apêndices	
Apêndice 1: Questionário sobre disponibilidade de diagnóstico laboratorial de S. Del 22q11.2	162

<b>Tabela 1</b> Frequência dos principais sinais clínicos encontrados na S. Del 22q11.2	43
<b>Tabela 2</b> Porcentagem de pacientes com deleção em 22q11 em diferentes trabalhos	45
<b>Tabela 3</b> Número de amostras encaminhadas de acordo com a origem	59
<b>Tabela 4</b> Aspectos relacionados ao diagnóstico clínico e propedêutica armada de síndrome de deleção 22q11.2 em 11 centros pesquisados	75
<b>Tabela 5</b> Aspectos relacionados ao envio de amostras para Unicamp nos centros pesquisados	76
<b>Tabela 6</b> Motivos que impediram o encaminhamento de casos para diagnóstico	76
<b>Tabela 7</b> Disponibilidade local ou regional de exames laboratoriais nos 11 centros pesquisados	78
<b>Tabela 8</b> Aspectos relacionados à infraestrutura para a realização dos exames nos 11 centros pesquisados	79
<b>Tabela 9</b> Resultados da análise citogenética	81
<b>Tabela 10</b> Resultados da triagem de microdeleção em 22q11.2	85
<b>Tabela 11</b> Distribuição de pacientes com e sem deleção entre as diferentes faixas etárias	90
<b>Tabela 12</b> Frequência de anomalias palatais nos pacientes com e sem deleção em 22q11	92
<b>Tabela 13</b> Frequência de cardiopatia congênita em 30 pacientes com deleção e 58 pacientes sem deleção em 22q11, que realizaram o ecocardiograma	92
<b>Tabela 14</b> Frequência de dismorfismos faciais nos pacientes com e sem deleção em 22q11	94
<b>Tabela 15</b> Frequência de alterações no desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental nos pacientes com e sem deleção em 22q11	95

<b>Tabela 16</b> Frequência de sinais clínicos nos pacientes com e sem deleção em 22q11	95
<b>Tabela 17</b> Custos da investigação de deleção em 22q11	97
<b>Tabela 18</b> Características das técnicas de FISH e MLPA	98

<b>Figura 1</b> Representação da região 22q11.2, mostrando a localização das LCRs e frequência de diferentes deleções mediadas pelas LCRs.	44
<b>Figura 2</b> FISH com sonda específica para a região 22q11 (vermelho) e sonda controle (22q13 – verde). A: Amostra normal. B: amostra com deleção em 22q11	83
<b>Figura 3</b> Perfil dos picos de fluorescência de uma amostra com microdeleção (inferior) comparada a uma amostra normal (superior)	84
<b>Figura 4</b> Distribuição do número total de amostras encaminhadas de pacientes com e sem deleção, de acordo com a região do país	85
<b>Figura 5</b> Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra normal	86
<b>Figura 6</b> Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção típica de ~ 3 Mb (sondas CLTCL1 a LZTR1)	86
<b>Figura 7</b> Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção de ~ 1,5 Mb (sondas CLTCL1 a DGCR8)	87
<b>Figura 8</b> Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção típica de ~ 3 Mb (sondas CLTCL1 a LZTR1) e duplicação em 22q11.23 (sondas SMARCB1 a SNRPD3)	87
<b>Figura 9</b> Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com duplicação em 8p23.1 (sondas PPP1R3B a GATA4).	88
<b>Figura 10</b> Frequência de alterações encontradas nos 100 pacientes estudados	89
<b>Figura 11</b> Distribuição de idade dos pacientes com e sem deleção	91

**Figura 12** Distribuição do número de amostras recebidas mensalmente durante os 30 meses de estudo 77

99

ABRACITO	Associação Brasileira de Citogenética
ACF	Anomalias craniofaciais
aCGH	<i>array – Comparative Genomic Hybridization</i> (Hibridação genômica comparativa em <i>array</i> )
ACM	Anomalias congênitas múltiplas
<i>aGH</i>	<i>array Genomic Hybridization</i> (Hibridação genômica em <i>array</i> )
AMB	Associação Médica Brasileira
ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
arr	array
ARSA	Arilsulfatase A
CADEFI	Centro de Atenção aos Defeitos da Face
CAIF	Centro de Atendimento Integral ao Fissurado labiopalatal
CAP	Colégio Americano de Patologia
CFM	Conselho Federal de Medicina
CIA	Comunicação interatrial
<i>CLTCL1</i>	<i>Clathrin, Heavy Polypeptide-Like 1</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNRM	Comissão Nacional de Residência Médica

CRANE	<i>Craniofacial Anomalies Network</i>
del	deleção
der	derivativo
<i>DGCR8</i>	<i>DiGeorge Critical Region 8</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dup	duplicação
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i> com Fluorescência)
FL	Fenda labial
FLP	Fenda Labiopalatal
FOTs	Fendas orofaciais típicas
FP	Fenda Palatal
<i>FRG1</i>	<i>FSHD Region Gene 1</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA-Binding protein 4</i>
ICER	<i>Incremental Cost Effectiveness Ratio</i>
ins	inserção
inv	inversão
LCRs	<i>Low copy repeats</i>
<i>LZTR1</i>	<i>Leucine Zipper-Like Transcriptional Regulator 1</i>
mar	marcador
Mb	Megabases

MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCFB	Projeto Crânio-Face Brasil
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PNH	Política Nacional de Humanização
<i>PPP1R3B</i>	<i>Protein Phosphatase 1, Regulatory subunit 3B</i>
PSF	Programa de Saúde da Família
RCEI	Razão Custo-Efetividade Incremental
RDNPM	Retardo do Desenvolvimento Neuropsicomotor
RRTDCF	Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais
SBG	Sociedade Brasileira de Genética
SBGC	Sociedade Brasileira de Genética Clínica
SBGM	Sociedade Brasileira de Genética Médica
<i>SHANK3</i>	<i>SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 3</i>
<i>SMARCB1</i>	<i>SWI/SNF-related, Matrix-associated, Actin-dependent Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>SNRPD3</i>	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide D3</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SVCF	Síndrome Velocardiofacial

<i>TBX1</i>	<i>T-box 1</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TUPLE1</i>	<i>Tup-Like Enhancer of Split 1</i>
WHO	World Health Organization



---

A aplicação de modernos conhecimentos sobre causa, efeito e métodos diagnósticos de doenças genéticas para cuidados de saúde é bastante complexa, especialmente no Brasil onde o sistema de saúde é predominantemente público. A síndrome de deleção 22q11.2 (S. Del 22q11.2) é a condição geneticamente determinada mais comum em indivíduos com anomalias palatais, com prevalência de 1/4.000 nascimentos. Considerando esta prevalência, as características do sistema de saúde e da atenção em genética no Brasil, o principal objetivo deste estudo foi realizar estudo multicêntrico para diagnóstico da S. Del 22q11.2 como modelo para otimização de estratégias diagnósticas em genética médica. Para isso, verificou-se a disponibilidade do diagnóstico laboratorial da S. Del 22q11.2 em 11 serviços de genética de diferentes regiões do país, e este foi centralizado nos Laboratórios de Citogenética Humana e Genética Molecular da FCM/UNICAMP por 30 meses. Foram estudados 100 pacientes (48M:52F) e as técnicas utilizadas foram FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) e MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Disponibilidade anterior e temporária do diagnóstico laboratorial de deleção em 22q11, vinculada a projetos de pesquisa, foi informada por sete instituições, sendo detectada desigualdade regional. Microdeleção em 22q11 foi identificada em 35% dos pacientes e aberrações cromossômicas não envolvendo a região 22q11 foram detectadas em três casos, obtendo-se conclusão diagnóstica em 38% dos casos. Encontrou-se diferença estatisticamente significativa para alguns sinais clínicos apresentados entre os pacientes com e sem deleção. As técnicas de FISH e MLPA mostraram 100% de sensibilidade e especificidade. Considerando a infraestrutura necessária e a adaptação da técnica de FISH, que permitiu reduzir a quantidade de sonda utilizada, esta foi eficaz, mais econômica e mais rápida em comparação a MLPA. A investigação centralizada mostrou-se vantajosa. Aponta-se o modelo estabelecido como uma estratégia importante e factível para o Brasil. Os resultados deste estudo propiciaram reflexões que culminaram em sugestões para o incremento desta abordagem para esta e outras condições geneticamente determinadas em nosso país.



The introduction of new technologies of molecular diagnosis for health care has been a challenge in the last years, especially in Brazil, where the majority of the population is served by the public health system. The 22q11.1 deletion syndrome is the most common syndrome that has palatal anomalies as a major feature, with a prevalence of 1/4000 births. Considering this prevalence, the Brazilian health system characteristics and the current situation of medical and clinical genetic services in the country, the main aim of this study was to conduct a multicenter study for 22q11.2 deletion diagnosis as a model for the optimization of diagnostic strategies in medical genetics. We investigated the access to laboratorial diagnosis of 22q11.2 deletion at 11 genetic services and centralized this diagnosis for 100 patients with palatal abnormalities and suspicion of 22q11.2 deletion syndrome, referred from these centers during 30 months, at the Cytogenetics and Molecular biology laboratories of the FCM/UNICAMP. To detect 22q11 deletions FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) and MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) techniques were used. Previous and temporary availability for the diagnosis of 22q11 deletion, associated with research projects, was informed by seven centers, with remarkable geographic disparities. We detected 22q11 deletion in 35% of the patients, and chromosome abnormalities not related to 22q11 region in three patients; thus we reached diagnostic conclusion in 38% of the cases. There was significant difference between some clinical signs found in patients with or without 22q11 deletion. There was 100% of sensibility and specificity for both MLPA and FISH techniques. Considering the required infrastructure and the modifications in the FISH (allowing to reduce probe quantity), this technique was efficient, more economical and faster than MLPA. Centralizing the laboratorial diagnosis was considered advantageous, pointing to this model as an important and feasible strategy for genetic diagnosis in Brazil. These results allowed to suggestions for the improvement of laboratorial diagnosis of this and other genetic conditions in our country.



## *INTRODUÇÃO*

---



## 1. Introdução

Incorporar os avanços de conhecimento e tecnologia para a prática de saúde é um dos grandes desafios da área de Genética Médica. No caso do Brasil, em que o sistema de saúde é de financiamento eminentemente público, esta incorporação tecnológica é bastante complexa. Apesar de há quase uma década o grupo de malformações congênitas e anomalias cromossômicas ocupar o segundo lugar entre as causas de mortalidade infantil [1] e da criação de um campo para registro de defeitos congênitos na Declaração de Nascidos Vivos em 1999, os dados são escassos e não contribuem, efetivamente, para o reconhecimento da importância epidemiológica das doenças genéticas e defeitos congênitos, limitando o planejamento de políticas específicas.

Apesar disso, medidas governamentais isoladas de apoio ao diagnóstico e tratamento de doenças genéticas no Brasil existem há vários anos. Por exemplo, o Programa de Diagnóstico Precoce do Hipotireoidismo [2], normatizada com a instituição do Programa de Triagem Neonatal [3] e a inclusão dos exames de cariótipo na Tabela Unificada de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do Sistema Único de Saúde (SUS) [4].

Em 1993, foram incluídos na Tabela do Sistema de Informações Hospitalares procedimentos de correção de fissuras labiopalatais e implantes dentários osseointegrados e, em 1994, foram estabelecidas normas para credenciamento de serviços nestas áreas. Estas iniciativas culminaram, em 1998, na criação da Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais (RRTDCF) [5, 6, 7].

A prevalência de fendas labiopalatais, ou fendas orofaciais típicas (FOTs), é de 1:600-1.000 recém-nascidos [8]. De modo geral, os casos de fenda palatal (FP) são mais associados a outras anomalias que os casos de fenda labiopalatal (FLP), assumindo-se que as frequências sejam de

aproximadamente 50% e 30%, respectivamente. Entre os casos não isolados, aproximadamente 50% são de anomalias congênitas múltiplas sem diagnóstico específico, enquanto o restante corresponde a casos sindrômicos, de etiologia cromossômica ou gênica [8]. Neste grupo, a Síndrome de deleção 22q11.2 (S. Del 22q11.2), também conhecida como Síndrome Velocardiofacial (SVCF), é a mais comum associada à FP e possui incidência de aproximadamente 1/4000 nascimentos [9].

Além da considerável prevalência, a presença de co-morbidades e a necessidade de tratamento multiprofissional prolongado levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar as FOTs um problema de saúde pública, publicando o documento *Global Strategies to Reduce the Health-care Burden of Craniofacial Anomalies* [10].

A discussão formal sobre o estabelecimento de uma política pública de saúde em genética no Brasil foi iniciada em outubro de 2004, com a instituição do Grupo de Trabalho de Genética Clínica [11] e resultou, quatro anos depois, na publicação da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica [12], ainda não regulamentada.

Dentro deste contexto, em 2003, foi iniciado o Projeto Crânio-Face Brasil (PCFB), sediado no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e coordenado pela Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes. Com o objetivo de melhorar a atenção em saúde para portadores de anomalias craniofaciais e com proposta multicêntrica e multiprofissional, este projeto conta, atualmente, com a participação ativa e regular de três serviços da RRTDCF e cinco serviços de genética, além de cooperações individuais, nas suas três linhas de atuação: saúde pública, investigação de doenças específicas e educação.

Uma das iniciativas deste projeto foi realizar a primeira investigação da atenção à saúde em genética oferecida na RRTDCF. Entre 25 centros credenciados à RRTDCF, apenas 13 referiam ter

médico geneticista e 15 mencionaram a necessidade de encaminhar pacientes a outros serviços para uma avaliação genética completa (principalmente análise citogenética e molecular). Este dado corrobora que o acesso ao atendimento do especialista em genética clínica e a realização de exames complementares especializados é, de modo geral, aquém do necessário [13, 14, 15].

Para uma rede funcional e economicamente viável, as análises laboratoriais mais especializadas poderiam ser oferecidas por poucos centros de excelência. Uma rede laboratorial básica e de suporte, assim como a formalização da referência, seriam importantes para a melhoria do atendimento em genética no país [13].

Em 2006, o Projeto Crânio-face Brasil foi contemplado no primeiro Edital para Pesquisa em Genética Clínica no Sistema Único de Saúde (Edital MCT/ CNPq/ MS-SCTIE-DECIT 21/2006), com a “Proposta para a Inserção da Genética Clínica na Atenção a Portadores de Anomalias Craniofaciais no Sistema Único de Saúde” que permitiu, entre outras coisas, a adequação da estrutura do Laboratório de Citogenética Humana da FCM/ UNICAMP para a realização de exames de citogenética especializados para os centros participantes do PCFB.

Assim, o presente trabalho, idealizado neste período de readequação laboratorial e planejamento de implantação de centros de referência em genética laboratorial no sistema público de saúde, pretende contribuir para a discussão de estratégias diagnósticas e para formalização de centros de referência em investigação citogenética molecular de síndromes comuns, utilizando a Síndrome de deleção 22q11.2 como modelo.

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1. Aspectos do acesso aos serviços de saúde no Brasil**

O sistema de saúde brasileiro tem três subsetores: o subsetor público, no qual os serviços são financiados e providos pelo Estado nos níveis federal, estadual e municipal; o subsetor privado, no qual os serviços são financiados de diversas maneiras com recursos públicos ou privados; e, por último, o subsetor de saúde suplementar, com diferentes tipos de planos privados de saúde e de apólices de seguro, além de subsídios fiscais. Os componentes público e privado do sistema são distintos, mas estão interconectados, e as pessoas podem utilizar os serviços de todos os três subsetores, dependendo da facilidade de acesso ou de sua capacidade de pagamento [16, 17].

Desde 1988, o Brasil tem estabelecido um sistema de saúde dinâmico e complexo, o Sistema Único de Saúde – SUS [18], baseado nos princípios da saúde como direito do cidadão e dever do Estado. O SUS tem o objetivo de prover uma atenção abrangente e universal, preventiva e curativa, por meio da gestão e prestação descentralizadas de serviços de saúde, promovendo a participação da comunidade em todos os níveis de governo [16].

O acesso aos serviços de saúde no Brasil melhorou consideravelmente após a criação do SUS. Em 1981, antes da criação do SUS, 8% da população (9,2 milhões de pessoas) afirmava ter usado serviço de saúde nos últimos trinta dias, enquanto em 2008, 14,2% da população (26.866.869 pessoas) relatavam uso de serviços de saúde nos últimos quinze dias, o que representa um aumento de 174% no uso de serviços de saúde, em geral. O número de pessoas que busca a atenção básica aumentou cerca de 450% entre 1981 e 2008. Entretanto, ainda existem imensas desigualdades geográficas e sociais no acesso aos serviços de saúde no Brasil [16, 19].

O estudo de Travassos e colaboradores (2006) [19] reafirmou que o acesso aos serviços de saúde no país é fortemente influenciado pela condição social das pessoas e pelo local onde residem. Este estudo comparou o padrão das desigualdades geográficas e sociais no acesso aos serviços de saúde nos anos de 1998 e 2003, usando os dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). Foi demonstrado que, apesar de terem diminuído, as desigualdades sociais no acesso permaneceram presentes no período estudado, tanto nas crianças como nos adultos. No geral, verificou-se que a renda influenciou mais o acesso do que a escolaridade. Em particular, a renda mostrou-se fator importante no acesso aos serviços de saúde das crianças.

Quanto às desigualdades regionais, observou-se que os residentes nas regiões Sudeste e Sul tiveram maior acesso do que os residentes nas outras regiões. Entre 1998 e 2003, houve melhora no acesso em todas as regiões, com exceção da região Norte. No entanto, contrariamente à diminuição das desigualdades sociais no acesso, as desigualdades geográficas pioraram no período de estudo. O diferencial no acesso entre os residentes das regiões Norte e Nordeste e os residentes das regiões Sudeste e Sul aumentou, isto é, a melhora observada no acesso foi maior nas regiões mais desenvolvidas [19].

A implementação do SUS começou em 1990, quando foi aprovada a Lei Orgânica da Saúde (Lei 8.080/90), que especificava as atribuições e a organização do SUS. A partir de então, várias iniciativas foram tomadas, como a criação do Programa de Saúde da Família (PSF), o programa nacional de controle e prevenção de HIV/AIDS, a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o estabelecimento da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), entre outros. Assim, o SUS conseguiu melhorar amplamente o acesso à atenção básica e de emergência,

ampliar a cobertura de vacinação e assistência pré-natal e investir fortemente na expansão dos recursos humanos e de tecnologia [16, 17].

Concomitantemente ao desenvolvimento de normas legais que garantiram e orientaram a gestão, a operacionalização e o financiamento do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, o mundo passou por um avanço inédito na área da genética humana. Esse avanço abriu novos espaços para a aplicação da genética na área da saúde, revolucionando o conhecimento sobre causa e efeito das doenças e métodos de diagnóstico e criando novas possibilidades de terapias [20].

## **2.2. Genética humana e médica no Brasil**

Artigos publicados por autores brasileiros na área de genética humana já eram encontrados na literatura científica entre os anos 20 e o final dos anos 40, geralmente relatando a distribuição de grupos sanguíneos e frequência de traço falciforme em amostras populacionais. Entretanto, estes primeiros trabalhos não tiveram impacto científico relevante, mesmo em nosso país. Os trabalhos de pesquisadores brasileiros em genética humana começaram a ganhar notoriedade nos anos 50, tendo o seu apogeu entre os anos 60 e 80. Considerando os critérios de qualidade e quantidade de artigos publicados, o Brasil incluía-se entre os cinco países mais produtivos em pesquisas em genética humana naquela época, ficando abaixo apenas dos Estados Unidos e da Inglaterra [21].

Atualmente o Brasil apresenta importantes grupos de pesquisa em genética humana, tendo uma produção científica relevante na área. Em uma busca utilizando os termos “human genetics and Brazil” no banco de dados Pubmed são encontrados 5.315 artigos publicados, sendo 497 publicados no último ano [22]. No diretório de grupos de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq), utilizando o termo genética humana como parte do nome do grupo ou como nome ou palavra chave de linhas de pesquisa dos grupos, encontra-se 79 grupos cadastrados. Utilizando o termo genética médica encontra-se 28 grupos [23]. Provavelmente estes números estão subestimados devido à falha na identificação de grupos que não possuem estes termos no nome ou em sua linha de pesquisa, mas que atuam na área, e à presença de grupos no país, ainda não cadastrados.

A profissão de genética médica no Brasil começou a ser definida nos anos 60 e 70, com o trabalho de geneticistas humanos e médicos de diferentes especialidades treinados em genética médica. Estes fundaram, em 1986, a Sociedade Brasileira de Genética Clínica (SBGC - atual Sociedade Brasileira de Genética Médica – SBGM), com o objetivo de filiar-se a Associação Médica Brasileira (AMB). Entretanto, a despeito do notável desenvolvimento em genética humana e médica em algumas universidades brasileiras, existem poucas instituições acadêmicas no país que possuam departamentos de genética médica ou divisões similares, ou que pelo menos tenham introduzido cursos específicos de genética médica na grade curricular dos cursos de medicina [21, 24], limitando o entendimento e comprometendo a responsabilidade dos profissionais da saúde no manejo de doenças genéticas.

Ainda com relação ao ensino de genética médica, o Brasil conta com apenas sete programas de residência em genética médica acreditados pela Comissão Nacional de Residência Médica (CNRM), todos nas regiões sul ou sudeste do país [25]. Mais recentemente, este número aumentou para onze (SBGM, *comunicação pessoal*). Desde 1983, o Conselho Federal de Medicina incluiu a genética clínica como uma especialidade médica reconhecida e, em 1987, a SBGC, atualmente SBGM, foi incluída como uma sociedade independente dentro da AMB. O reconhecimento completo

da genética clínica como uma especialidade consolidada foi obtido em 2002, com a sua inclusão na lista das 50 especialidades totalmente aprovadas por uma comissão nacional com representantes da AMB, CNRM e Conselho Federal de Medicina (CFM) [24].

A SBGM concede o certificado de especialista em genética médica por meio de concursos anuais para a sua obtenção. O primeiro concurso para obtenção do título foi oferecido em 1993 e, desde então, 156 certificados foram concedidos [26].

Quanto ao atendimento em genética clínica, um levantamento realizado para avaliar a distribuição dos serviços no país revelou a existência de 64 serviços de genética, 58% no Sudeste (75% destes no estado de São Paulo), 26% no Sul, 11% no Nordeste e 5% no Centro-oeste. Nenhum foi registrado na região Norte. Entre 54 instituições médicas com atendimento em genética clínica, 58% eram públicas e 42%, privadas. Avaliação clínico-dismorfológica, exame de cariótipo e aconselhamento genético eram as principais atividades exercidas, enquanto apenas poucas unidades eram equipadas para análise cromossômica de alta resolução, hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) ou análises de DNA. Além disso, alguns hospitais especializados ofereciam atendimento em genética para condições genéticas específicas, como anomalias esqueléticas ou craniofaciais [24].

Outro estudo realizado em 2006, a partir de listagem de serviços de genética no Brasil, cadastros de professores de genética de cursos de medicina e relação de membros da SBGM e da Sociedade Brasileira de Genética (SBG), identificou 60 serviços no país, assim distribuídos: 33 instituições com atendimento clínico e presença de laboratório, principalmente de citogenética; 15 instituições com atendimento clínico sem laboratório de genética; oito instituições com laboratório em genética humana não vinculado a atendimento clínico; quatro instituições de ensino em genética, sem serviço clínico ou laboratorial [13].

Este mesmo estudo apontou que os principais problemas encontrados nos serviços de genética eram a dificuldade de acesso aos serviços, dificuldade de referência e contra-referência, concentração dos serviços nas capitais e em grandes áreas urbanas, pacientes com defeitos congênitos internados em unidades sem geneticista e tipo de vinculação dos serviços de genética clínica. Neste contexto, estes autores concluíram que ações para o estabelecimento de política em genética clínica deveriam ser deflagradas, preferencialmente sob a coordenação de grupo técnico vinculado ao Ministério da Saúde, tendo como objetivo organizar rede clínico-laboratorial na especialidade [13].

Sensível às reivindicações de geneticistas médicos e de associações de familiares e de pessoas afetadas por doenças genéticas, o Ministério da Saúde publicou em 2004 uma portaria instituindo um grupo de trabalho de genética clínica [11], o que culminou na publicação, em 2009, da portaria 81 [12], que instituiu, no âmbito do SUS, a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica.

Os objetivos da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica são: I - Organizar uma linha de cuidados integrais (promoção, prevenção, tratamento e reabilitação) que perpassasse todos os níveis de atenção, promovendo, dessa forma, a atenção por intermédio de equipe multiprofissional, com atuação interdisciplinar; II - possibilitar a identificação dos determinantes e condicionantes dos principais problemas de saúde relacionados a anomalias congênitas e doenças geneticamente determinadas, de forma a fornecer subsídios para a elaboração de ações e políticas públicas no setor, sem prejuízo da participação social; III - definir critérios técnicos mínimos para o funcionamento, o monitoramento e a avaliação dos serviços que realizam os procedimentos e técnicas em genética clínica; IV - incentivar a realização de pesquisas e projetos estratégicos destinados ao estudo de custo-efetividade, eficácia e qualidade e incorporação de tecnologias na área

de genética clínica; e V - qualificar a assistência e promover a educação permanente dos profissionais de saúde envolvidos com a implantação e a implementação da Política de Atenção Integral em Genética Clínica, em conformidade com os princípios da integralidade e da Política Nacional de Humanização (PNH) [12].

Passados mais de dois anos de sua publicação, a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica ainda não foi implementada. Em um trabalho que abordou as dificuldades de inserir a genética médica como parte do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, apontou-se como problemas estratégicos para a implementação desta política, cujo pilar central seria o aconselhamento genético, a falta de programas de formação em aconselhamento genético, o desconhecimento acerca de quantos profissionais existem para prestar esse aconselhamento e o provável baixo número de profissionais disponíveis. Assim, seria desejável uma atuação conjunta dos Ministérios da Saúde e da Educação para ampliar a educação em genética e a formação em aconselhamento genético para todas as profissões no campo da saúde. De acordo com os mesmos autores, seria essencial a inclusão da genética em programas como o de Saúde da Família, que permitiria um mapeamento da incidência das doenças genéticas no país e a implementação de aconselhamento genético, apesar do grande território e da heterogeneidade populacional do Brasil [20].

### **2.3. Anomalias craniofaciais e o Projeto Crânio-Face Brasil**

Entre os defeitos congênitos, as anomalias craniofaciais constituem um grupo diverso e complexo. A denominação genérica de anomalias craniofaciais inclui anomalias isoladas e múltiplas de etiologia genética ou não. Costumeiramente, refere-se à situação em que os arcabouços craniano e (ou) facial apresentam alterações de contorno [27].

A prevalência das anomalias craniofaciais varia de acordo com a região geográfica e grupo étnico considerado. Indubitavelmente, as FOTs constituem os exemplos mais frequentes, entre elas as mais comuns são as FLPs e as FPs. Dados sobre as anomalias craniofaciais na população brasileira são escassos e dispersos. A principal e mais abrangente fonte provém do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas (ECLAMC), que realiza vigilância epidemiológica dessas condições em maternidades voluntárias [27]. Com relação às FOTs, no Brasil, segundo dados do ECLAMC, a incidência de fendas labiopalatais é de 1/1000 nascimentos e de fendas palatais de 0,4/1000 nascimentos [28].

Estudos sobre oferta, qualidade e características organizacionais de serviços de ACF no mundo tiveram início na década de 80 [29, 30, 31, 32]. Reconhecendo a necessidade de potencializar esforços e estabelecer necessidades prioritárias, consensos globais e protocolos comuns de pesquisa nesta área, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou, no ano 2000, o projeto *Global Strategies to Reduce the Health-care Burden of Craniofacial Anomalies* [10], destacando-se, entre outros aspectos, a necessidade de identificação e disseminação de estratégias para aumentar a disponibilidade de assistência a todos os cidadãos e o incremento da sua qualidade [10].

O Brasil conta hoje com centros de excelência no tratamento de ACF, sendo o Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP reconhecido como referência mundial pela OMS [14]. A partir da década de 1990, mediante o processo de implantação do Sistema Único de Saúde (SUS), foram dados os primeiros passos para a efetiva inclusão da assistência aos portadores de ACF na pauta das políticas públicas de saúde.

Os principais marcos cronológicos desse processo são: 1993: inclusão de procedimentos de correção de FOTs e implante dentário osseointegrado na Tabela do Sistema de Informações

Hospitalares; 1994: estabelecimento de normas para credenciamento de serviços nas áreas FOTs e implante dentário osseointegrado; 1998: criação da Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais (RRTDCF) e 1999: inclusão de implante coclear na RRTDCF e estabelecimento de normas para credenciamento de serviços nesta área [5, 6, 7, 33].

A criação da RRTDCF constituiu a primeira medida concreta de ordenação da atenção à saúde de portadores de ACF no SUS. Sua normalização específica, gestão, gerenciamento e financiamento, são responsabilidades do Ministério da Saúde [7]. Atualmente, a RRTDCF é composta de serviços que realizam tratamento de portadores de FOTs, implante dentário e (ou) implante coclear. Esta rede compreende 29 centros de atendimento com a seguinte distribuição regional: um no norte, quatro no nordeste, dois no centro-oeste, 16 no sudeste e seis no sul do País [7].

O Projeto Crânio-Face Brasil (PCFB) foi concebido e lançado no ano 2003 pelo Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, tendo, como objetivo principal, a proposição de medidas de melhoria da atenção à saúde de pessoas com ACF no país e tem, como diretriz geral, a adesão voluntária dos serviços [14]. Suas estratégias são baseadas nos princípios de genética comunitária e nas diretrizes propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para atendimento de portadores de ACF [10].

Entre os resultados obtidos pelo PCFB, destacam-se a descrição das características gerais da atenção aos portadores dessas anomalias congênitas no País, por meio da avaliação da Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais do Sistema Único de Saúde (RRTDCF), a caracterização do atendimento prestado por serviços de saúde não integrantes da RRTDCF, além de

aspectos nutricionais e fonoaudiológicos de portadores de FOT e outras ACF no município de Campinas-SP [14, 27, 34, 35, 36].

De acordo com os estudos mencionados, foram identificados problemas relacionados a desigualdades regionais, imprecisão da clientela assistida, falta de integração entre os centros especializados e destes com os demais níveis de atenção à saúde, alta demanda por avaliação clínica, exames laboratoriais e aconselhamento genético, inadequação dos centros especializados aos parâmetros internacionais vigentes para serviços de ACF, destacando-se, entre estes, a ausência de geneticistas clínicos nas equipes, formação deficiente em genética dos profissionais de saúde em geral e despreparo dos profissionais da atenção básica e maternidades para atendimento às necessidades de saúde de portadores de ACF.

Um estudo específico do PCFB, que avaliou a inserção da genética clínica na RRTDCF, encontrou que entre 25 centros credenciados à RRTDCF, apenas 13 possuem geneticista clínico e 15 mencionaram a necessidade de encaminhar pacientes a outros serviços para uma avaliação genética completa (principalmente análise citogenética e molecular) [14]. Considerando a prevalência das FOTs, este constitui o principal grupo de anomalias craniofaciais atendidos nesses centros.

É importante a distinção entre FOTs isoladas e não isoladas que, por sua vez, podem ter ou não um diagnóstico sindrômico específico. Essa distinção tem implicação significativa para determinar condutas e risco de recorrência para os pacientes e suas famílias. Além disso, o sucesso do diagnóstico etiológico depende de um exame clínico acurado [8, 37]. Entre os casos não isolados, aproximadamente 50% são casos de anomalias congênitas múltiplas (ACM) sem diagnóstico específico, enquanto o restante corresponde a casos sindrômicos ou sequências. São

conhecidas hoje mais de 400 síndromes que apresentam FOTs como uma das características fenotípicas, e essas podem ser de etiologia cromossômica ou gênica [38, 39].

Entre as síndromes de etiologia cromossômica, destaca-se a Síndrome de deleção 22q11.2, também conhecida como Síndrome Velocardiofacial, que é a síndrome mais comum associada à fenda palatal.

#### **2.4. Síndrome de deleção 22q11.2**

A microdeleção em 22q11 é a causa das Síndromes de DiGeorge, Velocardiofacial (SVCF) e *Conotruncal anomaly face*. Antes da identificação da deleção em 22q11, essas síndromes eram consideradas condições distintas, mas atualmente sabe-se que essas condições representam a expressividade variável de um mesmo defeito genético. Com incidência de 1/4000 a 1/5000 nascimentos, a deleção em 22q11 é a mais comum entre as síndromes de microdeleção [40].

As principais características clínicas dessa condição são distúrbios cardíacos congênitos (principalmente defeitos conotruncais), aparência facial típica, anomalias palatais (principalmente insuficiência velofaríngea), hipocalcemia, deficiência imunológica, dificuldade de aprendizado e atraso no desenvolvimento [41]. Outras características de menor ocorrência são disfagia grave, deficiência do hormônio de crescimento, doenças autoimunes, perda auditiva, anomalias esqueléticas, anomalias renais e urogenitais, alterações oftalmológicas e anomalias gastrointestinais [42, 43]. Entretanto, há uma grande variabilidade fenotípica inter e intra-familiar, mais de 180 sinais clínicos diferentes já foram associados à síndrome de deleção 22q11.2, não existindo uma característica clínica única ou um grupo de características clínicas que está presente em todos os

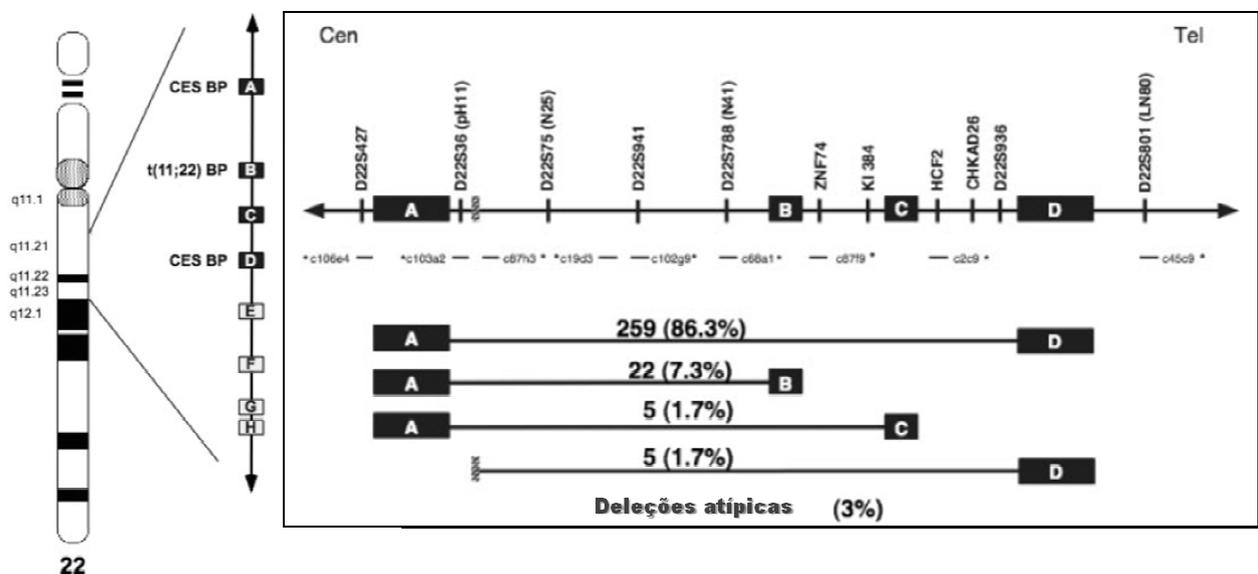
indivíduos afetados [44]. A frequência das principais características clínicas encontradas está descrita na Tabela 1. Estes dados foram extraídos de um estudo que incluiu 906 pacientes com S. Del 22q11.2 [45].

**Tabela 1:** Frequência dos principais sinais clínicos encontrados na S. Del 22q11.2.

<i>Sinais clínicos</i>	<i>Frequência</i>
Anomalias palatais	71%
<i>Insuficiência velofaríngea</i>	42%
<i>FP</i>	11%
<i>FP submucosa</i>	16%
<i>FLP</i>	2%
Cardiopatía congênita	77%
<i>Defeito de septo interventricular</i>	21%
<i>Defeitos conotrunciais/ Tetralogia de Fallot</i>	20%
Hipoacusia condutiva	31%
Hipoacusia neurosensorial	2%
Alterações oftalmológicas	49%
Alterações imunológicas	77%
Anomalias renais	36%
Distúrbios de comportamento/ psiquiátricos	54%

FP: fenda palatal; FLP: fenda labiopalatal.

A região onde ocorrem as deleções 22q11 é flanqueada por sequências repetidas com poucas cópias (*Low Copy Repeats, LCRs*), sendo que o pareamento desigual na meiose entre essas sequências com alta homologia resulta em deleções com pontos de quebra recorrentes (Figura 1). Entre os indivíduos com deleção em 22q11, cerca de 85% apresentam deleção de 3 Mb, 7% deleção de 1,5 Mb e o restante apresenta deleções atípicas na mesma região [46].



**Figura 1:** Representação da região 22q11.2, mostrando a localização das LCRs e frequência de diferentes deleções mediadas pelas LCRs. **Fonte:** Adaptado de Emanuel 2008 [46].

A porcentagem de pacientes com características clínicas da Síndrome de deleção 22q11.2 que possuem microdeleção em 22q11 é muito variável nos diferentes trabalhos realizados, sendo de 10% a 90% (Tabela 2) [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Isto se deve aos diferentes critérios de inclusão adotados nos estudos e à grande heterogeneidade clínica da Síndrome de deleção 22q11.2.

**Tabela 2:** Porcentagem de pacientes com deleção em 22q11 em diferentes trabalhos.

<i>Referência</i>	<i>Número de pacientes</i>	<i>Deleção em 22q11</i>	<i>Crítérios de inclusão</i>
Driscoll e cols. 1992 [47]	15	93%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge.
Tobias e cols. 1999 [48]	551	12%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge.
Bartsch e cols. 2003 [49]	295	20%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge.
Katzman e cols. 2005 [50]	297	5,4%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge, defeitos cardíacos isolados, entre outros.
Brunet e cols. 2006 [51]	295	4%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge, defeitos cardíacos isolados, entre outros.
Oh e cols. 2007 [52]	115	13,9%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge, FP, insuficiência velofaríngea.
Belangero e cols. 2009 [53]	29	25%	Diagnóstico clínico de SVCF/ DiGeorge, defeitos cardíacos conotrunciais isolados.
Rope e cols. 2009 [54]	64	55%	Diagnóstico clínico de Síndrome de DiGeorge.

Outras aberrações cromossômicas, ou mesmo microdeleções em outras regiões genômicas, também podem ser encontradas em pacientes com achados clínicos sugestivos desta síndrome sem deleção em 22q11. Diferentes trabalhos encontraram outras aberrações cromossômicas não envolvendo o cromossomo 22 em 1,7% a 3,7% dos pacientes [41, 55, 56]. Microdeleções em 10p14-15, 4q34 e 17p13.3 já foram encontradas em pacientes com fenótipo sugestivo de Síndrome de deleção 22q11.2 [57, 58, 59]. Três diferentes trabalhos que realizaram hibridação genômica em *arrays* (*aGH – array Genomic Hybridization*) em grupos pequenos de pacientes sem deleção em 22q11 encontraram alterações em 1q21.1, 1q43, 5q11.2, 7p22.1, 7q36.2 e 16p11.2. No total, foram encontradas alterações em seis de 44 pacientes estudados [60, 61, 62].

Embora os estudos de correlação genótipo-fenótipo ainda não tenham determinado com precisão os genes específicos responsáveis pelas características clínicas da síndrome, o gene *TBX1* foi descrito como principal candidato. Em alguns indivíduos com características clínicas da síndrome, mas sem deleção em 22q11, foram encontradas mutações no gene *TBX1* que foram associadas ao fenótipo [63, 64].

Os critérios clínicos para a indicação da triagem de deleção em pacientes com fendas palatais e suspeita de Síndrome de deleção 22q11.2 ainda não são claros, havendo considerável diferença entre o diagnóstico clínico e laboratorial. No entanto, acredita-se que fenda palatal isolada não é uma indicação para a triagem de deleção em 22q11.2, de acordo com dois estudos publicados em 2003 [9, 65].

A conclusão diagnóstica em casos suspeitos de Síndrome de deleção 22q11.2 é importante, para que se tenha prognóstico e orientações quanto a condutas antecipatórias mais específicas. O aconselhamento genético adequado só pode ser realizado após ter-se estabelecido um diagnóstico preciso [52].

## **2.5. Diagnóstico laboratorial da deleção 22q11.2**

A deleção em 22q11.2 foi identificada pela primeira vez através da análise do cariótipo com bandamento G [66]. Entretanto, mesmo com a utilização de técnicas de alta resolução, a identificação da deleção apenas através desta técnica é difícil e tem sensibilidade muito baixa, pois a deleção típica é submicroscópica, ou seja, trata-se de uma microdeleção. Deste modo, somente em uma minoria dos casos é possível que o diagnóstico seja confirmado desta forma.

A técnica de hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) com sonda de DNA específica para a região 22q11.2 tem sido utilizada rotineiramente desde 1992 e é considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico desta microdeleção cromossômica [67].

Em um trabalho de revisão sobre a Síndrome de deleção 22q11.2.2, recentemente publicado nos Estados Unidos, os autores consideraram a técnica FISH muito dispendiosa e que requer equipamento e treinamento substancial. Estes também apontaram que laboratórios comerciais cobravam cerca de US\$ 750,00 pelo exame. Além disso, apontaram outras duas desvantagens desta técnica: a demora para o resultado (de aproximadamente 3 a 14 dias) e a impossibilidade de detectar algumas deleções atípicas [45].

Alternativas à técnica de FISH para a detecção da deleção 22q11.2 têm sido amplamente utilizadas. Entre estas, encontram-se a utilização de análise de marcadores polimórficos de DNA, que podem ser marcadores de DNA microssatélite ou polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs* – *Single Nucleotide Polymorphism*) [68, 69, 70]; e a utilização de PCR em tempo real [71].

Além destas técnicas, cuja análise é lócus específica, testando-se apenas a região 22q11, a técnica de hibridação genômica em *arrays* (aGH) também pode ser utilizada. Ela tem a vantagem de, além de identificar precisamente a deleção na região 22q11, permitir a identificação de outras alterações em qualquer região do genoma, que podem estar relacionadas ao fenótipo naqueles pacientes sem deleção em 22q11. Esta técnica tem sido amplamente utilizada como ferramenta diagnóstica para estes pacientes nos Estados Unidos [45].

Uma nova técnica, chamada de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), foi desenvolvida para testar diferentes *loci* cromossômicos em um único experimento de biologia molecular [72]. Foi desenvolvido um *kit* para o diagnóstico de Síndrome de deleção 22q11.2, que

permite testar a região 22q11 com diferentes sondas, além de outras regiões cromossômicas, nas quais deleções foram associadas a pacientes com características clínicas da Síndrome de deleção 22q11.2. Em um estudo realizado por Fernandez e colaboradores (2005) [73], MLPA mostrou-se uma ferramenta eficiente, rápida e econômica para a triagem de deleções em pacientes com Síndrome de deleção 22q11.2.

No Brasil, o diagnóstico de deleção em 22q11, por diferentes técnicas, está disponível comercialmente em laboratórios particulares. Entretanto, como cerca de 80% da população utiliza o sistema público de saúde [25] e a proporção da população coberta por planos de saúde privados permanece entre 20-25% no Brasil [17], uma parcela muito pequena da população tem acesso a esses exames. Vale lembrar que apenas recentemente a pesquisa de microdeleção por FISH e a análise molecular de DNA têm suas coberturas obrigatórias pelos planos de saúde (Agência Nacional de Saúde Suplementar – ANS – Resolução normativa nº167 de 10 de janeiro de 2008).

O diagnóstico de deleção em 22q11 no serviço público de saúde no Brasil só ocorre, até o momento, com a participação dos pacientes em projetos de pesquisa em andamento nos serviços de genética, principalmente em hospitais universitários, que estão vinculados ao atendimento de pacientes pelo SUS.

Encontram-se poucos centros de pesquisa em genética no país que já realizaram trabalhos com a Síndrome de deleção 22q11.2, incluindo o diagnóstico laboratorial [53, 70, 74, 75]. Todos estes centros estão no sul e sudeste e a disponibilidade do diagnóstico encerra-se com o término do projeto e a falta de recursos financeiros para continuidade no oferecimento do diagnóstico. Ainda, na maioria das vezes, este é disponibilizado apenas para o centro onde o estudo está sendo realizado ou para poucos centros próximos a este.

Em uma avaliação para que a genética clínica seja formalizada como uma rede funcional no âmbito do SUS, com relação à cobertura laboratorial, Horovitz e colaboradores (2006) [13] apontaram que para uma rede funcional e economicamente viável, não seria justificada a implantação de laboratórios especializados em todos os serviços ou mesmo em todos os estados da União, sendo que as análises mais especializadas poderiam ser oferecidas por poucos centros de excelência. No mundo inteiro, laboratórios vêm especializando-se em diagnósticos específicos, não sendo tal fato diferente no Brasil. Pela diversidade das doenças genéticas e diferentes técnicas de identificação existentes, muitas vezes é necessário encaminhar amostras para diagnóstico a laboratórios em outros estados ou até mesmo em outros países.

Os mesmos autores consideram a organização de rede laboratorial básica e de suporte, assim como a formalização da referência, uma importante iniciativa para a melhoria do atendimento em genética no país [13].

Este estudo foi desenhado com base na prevalência das FOTs e da Síndrome de deleção 22q11.2, nas características do sistema de saúde brasileiro, em que já existe a RRTDCF atuando em nível terciário, e da atenção em genética no Brasil e, ainda, nas possibilidades advindas do PCFB. Com ele, pretende-se contribuir para a reflexão sobre aspectos a serem considerados na elaboração de estratégia de investigação laboratorial funcional em genética para nosso país.



## *OBJETIVOS*

---



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Realizar estudo multicêntrico para diagnóstico da síndrome de deleção 22q11.2 como modelo para otimização de estratégias diagnósticas em genética médica.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Verificar a disponibilidade das técnicas necessárias para o diagnóstico laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2 nas instituições participantes deste estudo;
- Investigar microdeleção em 22q11 ou outras aberrações cromossômicas, relacionadas ou não à região 22q11, em pacientes com anomalias palatais e hipótese diagnóstica da Síndrome de deleção 22q11.2;
- Comparar os sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11;
- Calcular os custos para o diagnóstico e avaliar as vantagens e desvantagens de diferentes técnicas laboratoriais;
- Descrever os resultados de dois anos de funcionamento de um centro de investigação laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2.



*CASUÍSTICA E MÉTODOS*

---



## **4. Casuística e Métodos**

### **4.1. Casuística**

Foram incluídos neste estudo 100 pacientes portadores de anomalia palatal e hipótese diagnóstica da Síndrome de deleção 22q11.2 aventada por médico geneticista. A razão de sexo foi 48M:52F. A idade média foi de 11 anos, sendo que variaram desde um mês a 33 anos. Como investigação complementar mínima, solicitou-se nasofibrosopia – para pacientes sem fenda palatal aparente – e ecocardiografia. Entretanto, a realização destes exames não foi considerada como critério de inclusão no trabalho. Foram excluídos indivíduos sem anomalia palatal, ainda que tivessem suspeita de deleção em 22q11.

No período de outubro de 2008 a março de 2011 foram encaminhadas amostras de 100 pacientes de 11 serviços com atendimento em genética clínica, de diferentes regiões do Brasil. Os serviços estão descritos a seguir e o número de amostras encaminhadas de cada serviço está descrito na Tabela 3.

01 – Serviço de Genética do Hospital Geral César Cals (Fortaleza – CE);

02 – Centro de Atenção aos Defeitos da Face – CADEFI (Recife – PE);

03 – Serviço de Genética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (Maceió – AL);

04 – Serviço de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (São José do Rio Preto – SP);

05 – Serviço de Genética Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Campinas – SP);

06 – Serviço de Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (São Paulo – SP);

07 – Serviço de Genética da APAE de São Paulo (São Paulo – SP);

08 – Centro de Atendimento Integral ao Fissurado labiopalatal – CAIF (Curitiba – PR);

09 – Centrinho Prefeito Luiz Gomes (Joinville – SC);

10 – Serviço de Genética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis – SC);

11 – Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre - RS);

Dentre estes, o serviço 05 é a instituição sede do Projeto Crânio-Face Brasil e os serviços 01, 02, 03, 04, 05 e 08 já eram cadastrados no PCFB e atuam regularmente como colaboradores neste projeto. Estes foram visitados pela coordenadora do projeto, para orientação quanto aos envios de amostras e preenchimento dos formulários.

Os serviços 02, 08 e 09 compreendem centros especializados em fendas orofaciais, pertencem à Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais (RRTDCF) e possuem, pelo menos, um médico geneticista como membro efetivo da equipe.

O centro sede (05) e os demais serviços de genética colaboradores do Projeto Crânio-Face Brasil compreendem unidades de genética que regularmente avaliam portadores de fendas orofaciais.

Os serviços de genética 06, 07 e 10 não atendem regularmente portadores de fendas, não eram cadastrados pelo Projeto Crânio-Face Brasil e atuaram como colaboradores eventuais. Estes se interessaram em participar do trabalho, pois receberam pacientes com hipótese diagnóstica de Síndrome de deleção 22q11.2 e não dispunham de suporte laboratorial na época.

**Tabela 3:** Número de amostras encaminhadas de acordo com a origem.

<i>Origem</i>		<i>Número de amostras</i>
	Porto Alegre: Hospital de Clínicas	5
	Florianópolis: Hospital Universitário/ UFSC	3
Sul	Joinville: Centrinho Prefeito Luiz Gomes	9
	Curitiba: Centro de Atendimento Integral ao Fissurado (CAIF)	33
		<b>50</b>
	Instituto da Criança/ FMUSP	1
São Paulo	APAE	2
Sudeste	Campinas: Hospital de Clínicas/ FCM/ Unicamp	21
	São José do Rio Preto: Hospital de Base/ FAMERP	11
		<b>35</b>
	Maceió: Hospital Universitário/ UFAL	10
Nordeste	Recife: Centro de Atenção aos Defeitos da Face (CADEFI)	4
	Fortaleza: Hospital Geral César Cals	1
		<b>15</b>
	<b>Total</b>	<b>100</b>

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Parecer N° 059/2008) (Anexo 2) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer N° 709/2008). Todos os indivíduos, ou seus responsáveis, que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

Todos os pacientes incluídos foram avaliados por médico geneticista, sendo preenchido um formulário padronizado de coleta de dados, elaborado especificamente para este estudo. Este foi baseado em revisão de literatura e contempla informações sobre as principais características clínicas encontradas na Síndrome de deleção 22q11.2 (Anexo 1).

Visando melhor caracterização clínica, nos casos em que se detectou deleção cromossômica, sempre que possível, foram solicitados os seguintes exames complementares: ressonância magnética ou tomografia computadorizada de crânio; ultra-som abdominal e de vias urinárias; avaliação oftalmológica e avaliação auditiva. Os custos desses exames foram previstos por ocasião do projeto.

Todos os resultados foram encaminhados aos médicos responsáveis pelos pacientes para que fossem repassados às famílias e, quando pertinente e se desejado pelos pacientes ou pelos seus responsáveis, realizassem o aconselhamento genético. Nos casos com deleção foi solicitada amostra dos genitores para investigação.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2 nas instituições participantes deste trabalho.**

Para verificar a disponibilidade deste diagnóstico nas instituições participantes, foi elaborado um questionário específico (Apêndice 1). Este contemplou aspectos relacionados:

- a) ao diagnóstico clínico de Síndrome de deleção 22q11.2;
- b) ao envio das amostras para a Unicamp;
- c) à disponibilidade local ou regional de exames laboratoriais, incluindo cariótipo, exames específicos para detecção de microdeleções, investigação da microdeleção 22q11, especificamente;
- d) à infraestrutura local disponível para a realização destes exames.

O questionário foi encaminhado por correio eletrônico, para os geneticistas clínicos de todos os centros participantes, que o preencheram e remeteram de volta pelo mesmo sistema. A análise dos questionários foi descritiva.

### **4.2.2. Exames laboratoriais**

O estudo disponibilizou material para coleta e armazenagem das amostras e caixas apropriadas para transporte, para os serviços que as enviaram regularmente. Após pesquisa sobre transportadoras disponíveis, ofereceu-se o custeio dos serviços de *courrier*, de acordo com a disponibilidade de cada cidade.

O exame de cariótipo foi utilizado como primeira ferramenta diagnóstica nos pacientes estudados, com o intuito de identificar aberrações cromossômicas envolvendo ou não a região 22q11. Este foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica da FCM/ Unicamp, para todos os pacientes sem cariótipo realizado previamente em sua instituição de origem.

### **Cariótipo**

Foi utilizada a cultura de linfócitos obtida pela técnica descrita por Moorhead e colaboradores (1960) [76], com pequenas modificações.

Cultura de linfócitos: Foram adicionados de 0,5ml a 1ml de sangue total heparinizado a frascos de cultura contendo 5ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen® - 11875-093) com 15% de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen® - 12657-029) e 0,1ml – 0,2ml de fitohemaglutinina (Gibco/Invitrogen® - 10576-015 - ou Sigma® - L8754). Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por 72 horas. Duas horas antes do fim desse período, foram acrescentados 0,02 ml de brometo de etídio 1mg/ml (Sigma® E8751) e 0,04 ml de colchicina 4x10E-5M (Sigma C9754®) à cultura de linfócitos. Ao final desse período de incubação foi realizada a hipotonia por 20 minutos, utilizando-se solução hipotônica de KCl 0,075M (Merck®) a 37°C. Após a hipotonia foi realizada a fixação utilizando-se como fixador metanol (Merck®) + ácido acético (Merck®) na proporção 3:1.

Preparação das lâminas: Lâminas para microscopia foram mergulhadas em etanol por alguns minutos e secas com papel macio. De três a quatro gotas do material, após fixação, foram pingadas, com pipetas Pasteur, sobre as lâminas. As lâminas foram colocadas em uma estufa na temperatura de aproximadamente 55°C durante alguns minutos e foram observadas em microscópio de contraste de fase.

Obtenção de bandamento G: Esse bandamento foi realizado de acordo com a técnica descrita por Sanchez e colaboradores (1973) [77], com pequenas modificações. As lâminas foram incubadas em tampão fosfato de Sorensen 0,06M pH 6,8 em banho-maria a 37°C por um período que variou de 10 a 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram coradas com eosina azul de metileno segundo Wright (Merck®) diluído em tampão fosfato de Sorensen na proporção de 1:3 por três a seis minutos.

Análise Cromossômica: Foram analisadas ao microscópio óptico comum 20 metáfases de cada indivíduo. A resolução obtida foi de aproximadamente 500 bandas por lote haplóide. Pelo menos duas metáfases de cada indivíduo foram capturadas e cariotipadas utilizando o sistema de cariotipagem *BANDView* da *Applied Spectral Imaging*®.

### **Triagem de microdeleção em 22q11**

A triagem de microdeleção em 22q11 foi realizada pelas técnicas de MLPA e FISH.

#### **MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*):**

A técnica de MLPA foi descrita pela primeira vez por Schouten e colaboradores em 2002 [72]. Detalhes sobre o princípio desta técnica foram descritos anteriormente no trabalho de Lincoln de Carvalho (2009) [78].

A amostra utilizada para a técnica de MLPA foi o DNA genômico extraído de sangue periférico, extraído pelo método fenol-clorofórmio [79].

Utilizou-se o kit P250-A1 (MRC – Holland®), que contém 30 sondas para o cromossomo 22 (sendo 14 localizadas na região mais comumente deletada, e outras em regiões de deleções atípicas ou utilizadas como controle) e 16 sondas para outros *loci* em diferentes cromossomos, utilizadas

como controle, ou nos quais deleções também foram relatadas em pacientes com características clínicas da Síndrome de deleção 22q11.2.

A técnica de MLPA foi realizada segundo o protocolo original descrito por Schouten e colaboradores (2002) [72], com pequenas modificações.

a) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas: As amostras de DNA foram diluídas (para obter-se uma concentração de 250 ng de DNA) em 5  $\mu$ L de solução TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). As amostras diluídas foram submetidas a uma temperatura de 95°C por cinco minutos, e em seguida a 25°C antes de serem retirados do termociclador. Após a desnaturação, foram acrescentados 1,5  $\mu$ L do *SALSA Probemix* e 1,5  $\mu$ L do *MLPA buffer* a cada tubo. O mix foi incubado a 95°C por um minuto e em seguida permaneceu a 60°C por 16 horas.

b) Reação de ligação: No termociclador, em uma temperatura de 54°C, foram adicionados 32  $\mu$ L de mix ligase-65 às amostras. As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos e em seguida a 98°C por cinco minutos.

c) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Em um novo tubo foram adicionados 4  $\mu$ L de *SALSA PCR buffer*, 26  $\mu$ L de água estéril e 10  $\mu$ L do produto da reação de ligação. A uma temperatura de 60°C, foi adicionada a enzima (*Polymerase mix*) e imediatamente se iniciou a reação de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos  $\rightarrow$  30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C. Ao final dos ciclos  $\rightarrow$  20 minutos a 72°C.

d) Separação dos produtos amplificados: Em uma placa de sequenciamento foram adicionados de 0,6 a 1,0  $\mu$ L do produto da PCR, 0,25  $\mu$ L de ET-550R (*size standar*) e 7  $\mu$ L de

Tween-20 0,1%. A leitura dos produtos amplificados foi realizada no sequenciador automático Megabace 1000 (*Amersham-Pharmacia*<sup>®</sup>).

e) Visualização e análise dos resultados: A visualização dos resultados foi realizada com o software *Fragment Profiler* (*GE Healthcare*<sup>®</sup>). Em seguida a análise dos dados foi realizada em planilha de Excel (*Microsoft*<sup>®</sup>) elaborada especificamente para a análise dos resultados obtidos pelo kit de MLPA P250 (*MRC-Holland*<sup>®</sup>), pelo grupo do *National Genetics Reference Laboratory* – Manchester, disponível gratuitamente em seu site (<http://www.ngrl.org.uk/Manchester/projects/informatics/mlpa>).

Tecnicamente, os dados foram normalizados, dividindo-se valores de altura do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela altura do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle.

Os resultados foram considerados normais quando a altura de todos os picos do gráfico gerado, após normalização, encontrou-se entre 0,75 e 1,25. Exceções foram as sondas TBX1 e FRG1, para as quais variações normais, devido à presença de *SNPs* próximo aos sítios de ligação da sonda, já eram conhecidas.

Quando disponível, o DNA dos genitores de indivíduos com alterações também foi testado.

#### **FISH (Hibridação *in situ* com Fluorescência):**

Para a realização da técnica de FISH foram utilizadas suspensões celulares obtidas a partir de cultura de linfócitos.

Utilizou-se o kit de sondas *dual color* TUPLE1 da marca Kreatech<sup>®</sup>. Este contém uma sonda de 220 Kb marcada em vermelho, mapeada em 22q11.21, a região comumente deletada nos indivíduos com deleção em 22q11, que inclui o gene *TUPLE1*; e uma sonda de 130 Kb, marcada em verde, mapeada em 22q13, incluindo os genes *ARSA* e *SHANK3*, utilizada como controle para a investigação de deleção em 22q11.

O método utilizado foi o descrito pelo fabricante, com modificações. As principais modificações foram a diminuição da área de hibridação na lâmina e a diluição da sonda em tampão de hibridação, sem prejuízo na qualidade do sinal fluorescente, garantindo a sensibilidade e especificidade do método. Este método foi validado previamente, utilizando-se controles positivos e negativos, e comparando-se a intensidade do sinal de fluorescência entre as lâminas onde se aplicou a quantidade indicada pelo fabricante ou metade da quantidade diluída em tampão de hibridação.

a) Preparação e pré-tratamento das lâminas:

Pingou-se o material em lâminas limpas em álcool e estas permaneceram por uma noite em temperatura ambiente ou em estufa a 37°C. As lâminas foram observadas ao microscópio para marcar área onde seria aplicada, incubadas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0) a 37° C (+/- 1°C) durante 20 a 60 minutos e desidratadas em uma série de etanóis a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada.

b) Co-desnaturação:

Aplicou-se 5 µl da sonda diluída na proporção 1:1, em tampão de hibridação, sobre a área previamente selecionada da lâmina; cobriu-se com lamínula de 11x22 mm e selou-se com cola especial. Colou-se as lâminas em uma placa aquecida a 75°C (+/- 1°C) por 5 a 10 minutos.

c) Hibridação:

As lâminas com a sonda, após desnaturação, foram colocadas em uma caixa úmida, em estufa a 37°C (+/- 1°C) por uma noite (de 12 a 16 horas).

d) Pós-hibridação:

Removeu-se a lamínula e toda a cola, cuidadosamente; colocou-se as lâminas em uma solução de 2x SSC/0.1% Tween 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente; a seguir em uma solução de 0,4xSSC/0.3% Tween 20 a 72°C (+/-1°C) (pH 7,0) por 2 minutos, sem agitação; e por último em uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 1 minuto em temperatura ambiente, sem agitação. Após secarem rapidamente em temperatura ambiente, aplicou-se 7 µl de DAPI e cobriu-se com um lamínula de 12x24 mm.

e) Análise:

Foram analisadas 20 metáfases ou 100 núcleos interfásicos, em microscópio de fluorescência da Olympus<sup>®</sup> com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o software *FISHView* da *Applied Spectral Imaging*<sup>®</sup>.

#### **4.2.3. Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11**

Todos os pacientes foram examinados por médico geneticista e os dados clínicos obtidos foram descritos em formulário padronizado, elaborado especificamente para este estudo. Estes foram

armazenados em uma base de dados desenvolvida no programa Microsoft Office Access 2007 (*Microsoft*<sup>®</sup>).

A análise foi descritiva e para o cálculo da porcentagem de pacientes que apresentaram determinados sinais clínicos, foram considerados apenas os campos que continham informação completa e preenchida corretamente no *check list* encaminhado.

Os dados foram exportados para uma planilha do programa Microsoft Office Excel (*Microsoft*<sup>®</sup>) e somou-se o número de pacientes, dentre os diferentes grupos (com e sem deleção), que apresentaram os sinais clínicos mais frequentes na Síndrome de deleção 22q11.2.

Foram analisados: Gênero, idade, anomalias palatais, cardiopatia congênita, alterações imunológicas, hipocalcemia, desenvolvimento neuropsicomotor e presença de alterações comportamentais, desenvolvimento somático, déficits auditivos, alterações oftalmológicas, alterações neurológicas, alterações esqueléticas, alterações de trato urinário e do sistema gastrointestinal.

Para a análise estatística foi utilizado o programa EpiInfo versão 6.04b no módulo *STATCALC calculator* (CDC-Atlanta-Georgia, 2011). Utilizou-se o teste do Qui-quadrado para comparação das proporções entre as diferentes variáveis, nos grupos com e sem deleção em 22q11. O nível de significância adotado foi de 5%. Considerou-se o valor de p não corrigido e para os casos com N menor ou igual a cinco utilizou-se o teste exato de Fisher.

#### **4.2.4. Cálculo de custos**

Para calcular os custos do diagnóstico foram considerados gastos com coleta de amostras, transporte para a Unicamp e insumos de laboratório, incluindo todos os reagentes necessários para a realização das técnicas utilizadas. Foram considerados os reagentes necessários para as técnicas atualmente padronizadas nos Laboratórios de Citogenética Humana e Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da FCM/Unicamp. Para tanto, os parâmetros de referência de marcas de reagentes foram os atualmente utilizados nestes laboratórios, que são todos de primeira linha.

Os valores foram calculados a partir de orçamentos realizados no ano de 2011, para compra em mercado nacional, em nome de pessoa física. Os valores foram agrupados de acordo com os procedimentos realizados, da seguinte forma: coleta de amostras, transporte, cultura de linfócitos, cariótipo com bandas G, FISH, extração de DNA e MLPA. Para o cálculo de valor de MLPA considerou-se o protocolo indicado pelo fabricante e, para FISH, considerou-se o protocolo indicado pelo fabricante e o protocolo adaptado, com redução na quantidade de sonda utilizada.

Para o cálculo de custos com recursos humanos utilizou-se como parâmetro o salário mensal pago para o cargo de biólogo da UNICAMP (R\$3.656,82), visto que esta instituição sediou o estudo. Estimou-se um número médio de 20 diagnósticos mensais realizados por este profissional, incluindo todos os procedimentos necessários para os exames de cariótipo, FISH e MLPA, e dividiu-se o valor salarial mensal por este número de diagnósticos.

Considerando a premissa de utilizar infraestrutura já existente e adequá-la à necessidade de saúde em Genética, não foram calculados os gastos com infraestrutura, visto que os Laboratórios de

Citogenética Humana e de Genética Molecular da FCM / UNICAMP estavam adequadamente equipados para as técnicas utilizadas.

#### **4.2.5. Comparação das técnicas utilizadas e avaliação de funcionamento do centro de investigação laboratorial**

Para comparar as vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas, foram considerados os seguintes aspectos:

- a) tipo e qualidade da amostra necessária para o procedimento;
- b) número de *loci* testados em cada reação;
- c) número de amostras processadas;
- d) equipamentos necessários;
- e) número de etapas;
- f) complexidade dos procedimentos;
- g) sensibilidade e especificidade;
- h) tempo necessário para diagnóstico e;
- i) custo.

A avaliação de funcionamento do centro de investigação laboratorial foi descritiva e compreendeu aspectos relacionados ao:

- a) transporte de amostras;
- b) número de amostras recebidas por mês e;
- c) tempo para entrega dos resultados.



## *RESULTADOS*

---



## 5. Resultados

### 5.1. Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2 nas instituições participantes deste trabalho.

Os questionários enviados aos 11 centros foram respondidos pelos médicos geneticistas responsáveis pelo atendimento dos pacientes. As informações encaminhadas pelos centros estão descritas nas Tabelas 4 a 8. Informações adicionais descritas no questionário, que foram consideradas relevantes para a discussão quanto às dificuldades de diagnóstico, foram transcritas nesta seção.

**Tabela 4:** Aspectos relacionados ao diagnóstico clínico e propedêutica armada de síndrome de deleção 22q11.2 em 11 centros pesquisados.

<i>Avaliação/ exames disponíveis</i>	<i>Número de serviços com avaliação ou exame disponível</i>
Ecocardiografia	10
Tomografia computadorizada de crânio	10
Ultrassonografia de abdômen e vias urinárias	10
Radiografia	10
Avaliação oftalmológica	09
Avaliação otorrinolaringológica	09
Nasofibrolaringoscopia	07
Ressonância magnética de crânio	06

Os resultados referentes ao envio de amostras encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5:** Aspectos relacionados ao envio de amostras para Unicamp nos centros pesquisados.

		<i>Número de serviços</i>
Tiveram casos que não foram encaminhados		05
Tiveram dificuldades no envio de amostras		03
<i>Forma de envio</i>	Serviço expresso de postagem	06
	<i>Courrier</i>	02
	Ambos	01
	Entrega direta	02

Cinco serviços relataram ter pacientes dos quais não puderam encaminhar amostras. O número de casos que não puderam ser encaminhados variou de 2 a 10, dependendo do centro. Os motivos citados pelos quais não puderam encaminhar os casos encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6:** Motivos que impediram o encaminhamento de casos para diagnóstico.

<i>Motivo</i>	<i>Número de serviços</i>
Não comparecimento do paciente à consulta agendada	04
Dificuldade de reconvocação de pacientes do serviço	04
Falta de transporte para os pacientes até o centro de atendimento	01
Falta de interesse da família na investigação diagnóstica	01
Dificuldade de coleta em criança	01
Falta de exames complementares que contribuem para a suspeita de Síndrome de deleção 22q11.2	01

Três serviços relataram ter dificuldades no envio de amostras, em um serviço apontou-se a desorganização do serviço de coleta e entrega da empresa responsável pelo transporte das amostras. Para outros dois serviços as respostas do questionário quanto a este aspecto estão transcritas abaixo:

*“Para todos os pacientes eu pessoalmente os levei ao laboratório municipal para coleta (o que não fica perto do local de atendimento), levei a amostra ao Correio e paguei do meu próprio bolso o envio. Tive que fazer cada coleta isoladamente por dificuldade de conciliar vários pacientes no mesmo dia”.*

*“Ainda não há um regime bem estabelecido para coleta e armazenamento das amostras para exames genéticos. Também não há um serviço de envio das amostras, de modo que eu precisava embalar as amostras e os pacientes levavam as mesmas até o correio e pagavam pelo SEDEX”.*

Com relação à disponibilidade do exame de cariótipo, seis serviços relataram tê-lo disponível na própria instituição. Quanto à identificação de microdeleções, cinco centros relataram ter técnicas disponíveis para tal investigação, incluindo FISH, MLPA ou outros métodos moleculares. Sendo que dois tinham disponibilidade na própria instituição, um em outra instituição e dois em ambas (Tabela 7).

A investigação específica da deleção 22q11 já esteve disponível para seis serviços, sendo que dois já tiveram disponível na própria instituição, três em outra instituição e um em ambas (Tabela 7). A maioria dos serviços citou a disponibilidade por meio de projetos de pesquisa e que esta foi

interrompida devido ao término dos projetos. Dois serviços citaram a disponibilidade no setor privado, com pagamento pela secretaria de saúde pública ou por plano de saúde. Outros dois serviços relataram já ter tido este exame disponível com recursos de assistência, mas que foi interrompido devido à falta de recursos.

**Tabela 7:** Disponibilidade local ou regional de exames laboratoriais nos 11 centros pesquisados.

Serviço	Cariótipo	Detecção de microdeleções			
		FISH	MLPA	Outros métodos moleculares	Microdeleção em 22q11 (especificamente)
01	N	N	N	N	N
02	N	N	N	N	N
03	N	N	N	N	N
04	S*	S* <sup>¶</sup>	N	N	S* <sup>¶</sup>
05	S*	S*	S*	S*	S*
06	S*	N	S* <sup>¶</sup>	S <sup>¶</sup>	S <sup>¶</sup>
07	S*	S <sup>¶</sup>	S <sup>¶</sup>	S <sup>¶</sup>	S <sup>¶</sup>
08	N	N	N	N	N
09	S*	N	N	N	S <sup>¶</sup>
10	N	N	N	N	N
11	S*	S*	S*	N	S*

N: não; S: sim; \* Própria instituição; <sup>¶</sup> Outra instituição. Serviços 01 a 03 – Nordeste; 04 a 07 – Sudeste; 08 a 11 – Sul. Serviço 05: instituição sede do projeto.

Quanto à presença de infraestrutura local para a realização dos exames, oito instituições possuíam infraestrutura para realizar o exame de cariótipo e cinco também para FISH. Quatro

instituições possuíam equipamentos em funcionamento para a realização de MLPA ou análise de DNA microssatélite e três instituições para a realização de PCR em tempo real. Três instituições possuíam profissionais com vínculo permanente, 02 com vínculo temporário e 03 com ambos os tipos de vínculo, para a realização e interpretação destas técnicas (Tabela 8).

**Tabela 8:** Aspectos relacionados à infraestrutura para a realização dos exames nos 11 centros pesquisados.

<i>Possuem equipamentos em funcionamento na instituição para a realização das seguintes técnicas</i>	<i>Número de serviços</i>
Cariótipo	08
FISH	05
MLPA ou análise de DNA microssatélite (Sequenciador)	04
PCR em tempo real	03
<i>Têm profissionais treinados para a realização e interpretação destas técnicas</i>	
Vínculo permanente	03
Vínculo temporário	02
Ambos	03

## **5.2. Exames laboratoriais**

### **5.2.1. Cariótipo**

O exame de cariótipo, realizado com o objetivo de identificar possíveis alterações envolvendo o cromossomo 22 ou outros cromossomos, precedeu a investigação de microdeleção em 22q11 pelas técnicas de MLPA e FISH.

Para parte dos pacientes, este exame estava disponível nas instituições onde foram atendidos, porém em quatro instituições (as três do nordeste e uma do sul, o CAIF) não havia disponibilidade local para sua realização. Nestes 48 casos, procurou-se realizar o exame de cariótipo no Laboratório de Citogenética/FCM/Unicamp, utilizando as mesmas amostras de sangue encaminhadas para o diagnóstico por FISH. Em sete casos, porém, este exame não pôde ser realizado porque não foi encaminhada amostra para cultivo de linfócitos ou por falha nesta técnica. Os resultados da análise citogenética pelo exame de cariótipo encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9:** Resultados da análise citogenética.

<i>Cariótipo</i>	<i>Número de indivíduos</i>
46,XX ou 46,XY	85
46,XX ou 46,XY com heteromorfismos cromossômicos: inv(9), 9qh+ ou 16qh+	04
46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21)*	01
46,XY,der(11)ins(11;?)(p13;?)*	01
46,XY,del(22)(q11q11)	01
46,XX,+mar	01
Não realizado	07
<b>Total</b>	<b>100</b>

\* Casos em que o cariótipo anterior foi normal.

#### **5.2.1.1. Anomalias cromossômicas detectadas pelo exame de cariótipo**

Foi possível a identificação de deleção em 22q11.2 por esta técnica em apenas um caso e identificou-se cromossomo marcador extranumerário em um outro caso.

Um paciente com resultado de cariótipo anterior normal teve resultados de MLPA e FISH também normais. Embora na época da primeira avaliação clínica o paciente apresentasse sinais compatíveis com Síndrome de deleção 22q11.2, incluindo insuficiência velofaríngea e cardiopatia, com a evolução do indivíduo, o quadro clínico não se manteve sugestivo de Síndrome de deleção 22q11.2. Após identificação de aberração cromossômica em outros membros da família encaminhados ao mesmo serviço, realizou-se um novo exame de cariótipo e encontrou-se o seguinte resultado: 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21). Portanto, o paciente possui uma aberração cromossômica desbalanceada, apresentando trissomia parcial do braço longo do cromossomo 15.

Esta alteração foi herdada de sua mãe, na qual se apresenta de maneira balanceada [46,XX,ins(9;15)(q32;q12q21)]. Após a correta identificação da aberração cromossômica, o diagnóstico pode ser concluído e os sinais clínicos apresentados foram associados à trissomia parcial do braço longo do cromossomo 15.

Outro paciente com resultado de cariótipo anterior normal, teve resultado de FISH para 22q11 normal e através da análise por MLPA encontrou-se uma duplicação em 8p23.1. Após este resultado, realizou-se novo exame de cariótipo que revelou o seguinte resultado: 46,XY,der(11)ins(11;?)(p13;?).

A identificação de aberração cromossômica nestes quatro casos já permitiu a conclusão diagnóstica e após a investigação dos genitores, o aconselhamento genético pôde ser realizado com limitações no caso com cariótipo 46,XY,der(11)ins(11;?)(p13;?) e no caso com cromossomo marcador extranumerário.

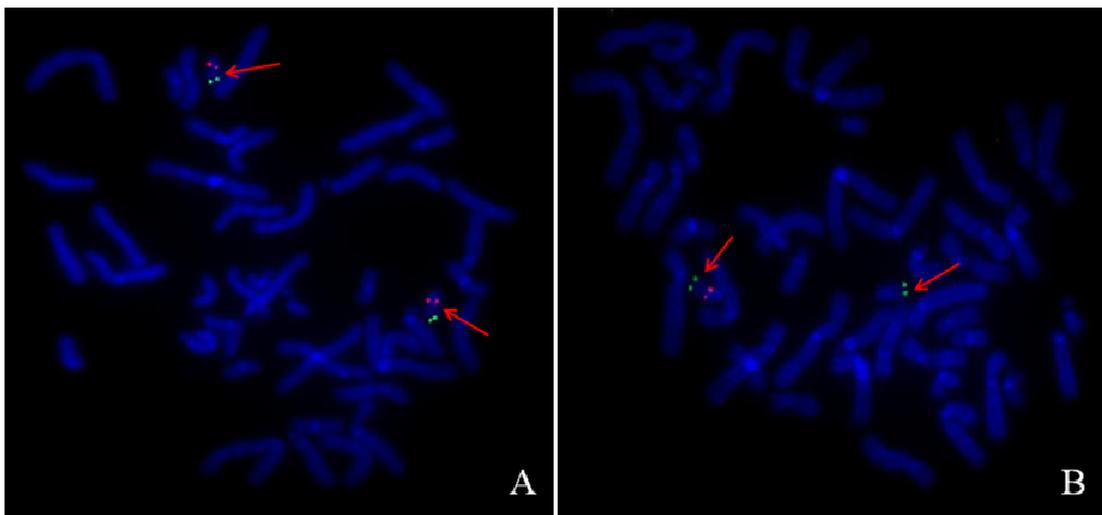
Para três destes casos, a investigação foi complementada pela técnica de hibridação genômica em *array* (*aGH*), disponível em estudos complementares do PCFB na instituição sede.

A análise por *aGH* no paciente com cariótipo 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21) revelou uma duplicação de 19.3 Mb no cromossomo 15 de q21.1 a q22.31 [44.275.184-63.567.267 – hg18], o que permitiu um refinamento do segmento do cromossomo 15 inserido no cromossomo 9. A partir da análise conjunta do cariótipo e da técnica de *aGH* o cariótipo final deste paciente foi designado como 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q21.1q22.31).arr 15q21.1q22.31(44,275,184-63,567,267)x3.

Os outros dois casos para os quais se realizou *aGH* serão citados no tópico a seguir.

### 5.2.2. Triagem de microdeleção em 22q11

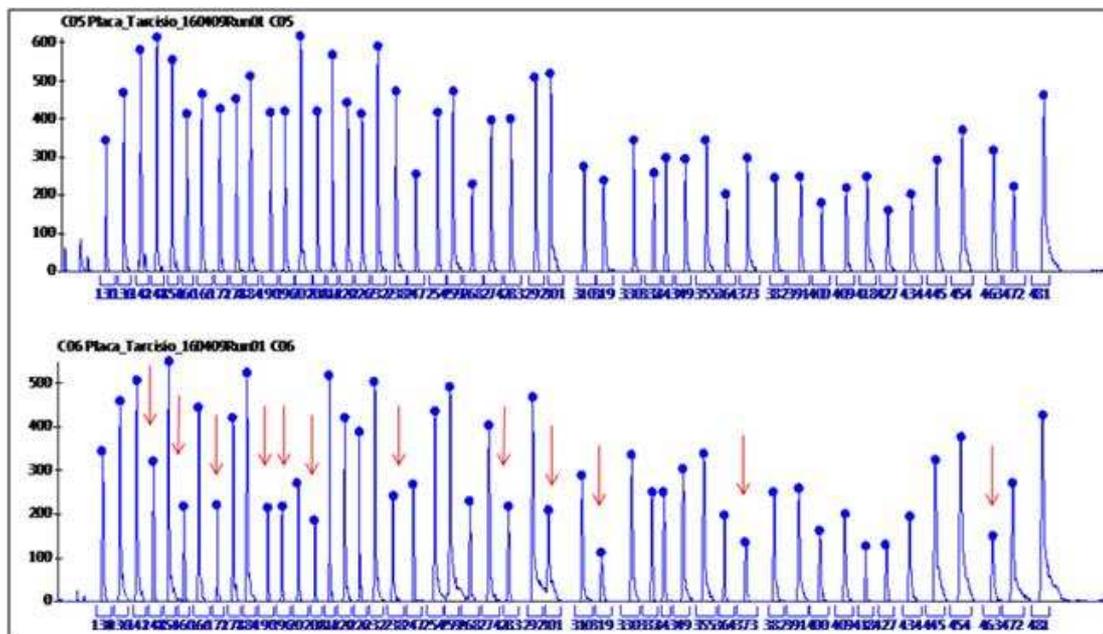
Realizou-se a triagem de microdeleção em 22q11 para todas as amostras encaminhadas, sendo que, em 78 casos, esta foi realizada pelas técnicas de MLPA e FISH e, em 22 casos, apenas por MLPA. Encontrou-se deleção em 22q11 em oito destes 22 casos. Os resultados foram concordantes em todos os 78 casos em que as duas técnicas foram utilizadas. Nos casos em que a triagem foi realizada apenas por MLPA, não foram encaminhadas amostras de sangue colhidas apropriadamente para o cultivo de linfócitos e realização de FISH. A Figura 2 mostra exemplos para a técnica de FISH de uma amostra normal (A) e uma amostra com deleção em 22q11 (B).



**Figura 2:** FISH com sonda específica para a região 22q11 (vermelho) e sonda controle (22q13 – verde). **A:** Amostra normal. **B:** amostra com deleção em 22q11.

Para a técnica de MLPA, a Figura 3 mostra a visualização, por meio do programa *Fragment Profiler*, dos picos de fluorescência de um indivíduo com microdeleção em 22q11.2 (inferior) comparados aos picos de fluorescência de um controle normal (superior). Cada pico de fluorescência corresponde a um fragmento amplificado, que por sua vez corresponde a uma sonda específica. No

gráfico gerado após normalização dos resultados em Excel, em uma amostra sem deleção a altura de todas as colunas deve estar entre 0,75 e 1,25; já em uma amostra com deleção, a altura das colunas, correspondentes às sondas localizadas no locus deletado, deve estar abaixo de 0,75.

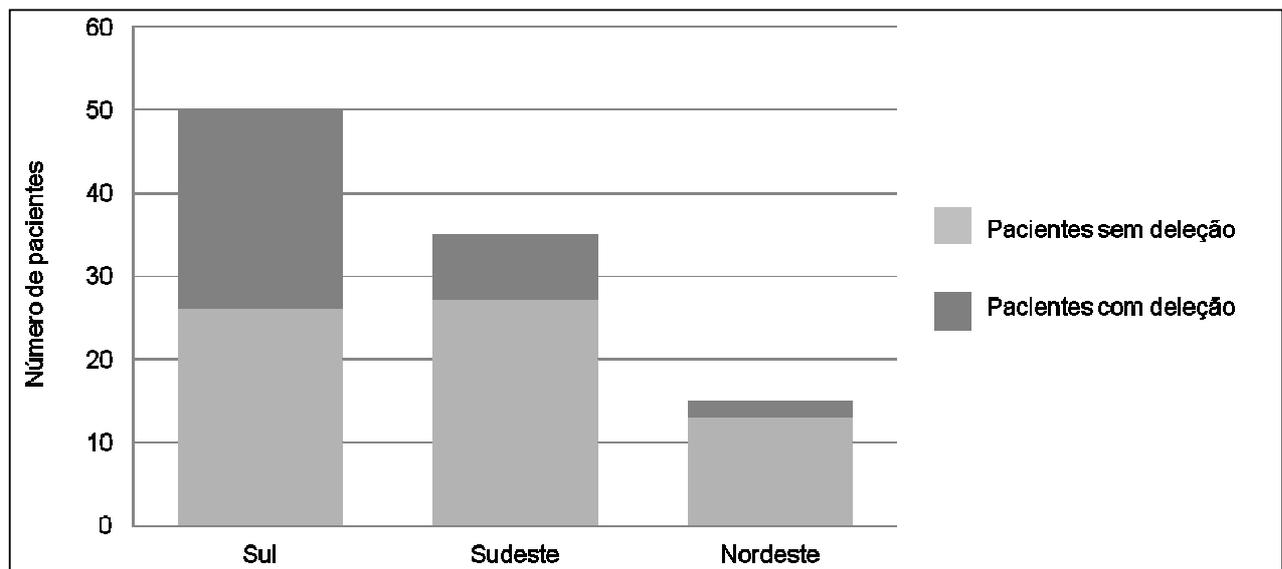


**Figura 3** Perfil dos picos de fluorescência de uma amostra com microdeleção (inferior) comparada a uma amostra normal (superior). As setas vermelhas indicam os fragmentos com amplificação diminuída.

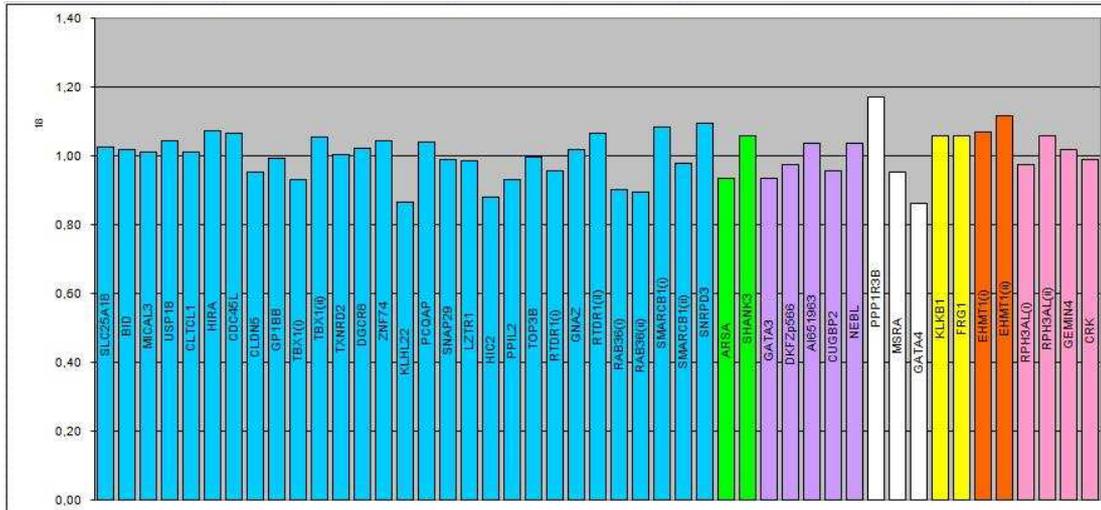
Encontrou-se microdeleção em 22q11 em 35 pacientes. Três apresentaram deleção de 1,5 Mb (Figura 7) e 32 indivíduos apresentaram deleção de 3 Mb (Figura 6), sendo que um deles apresentou uma duplicação em 22q11.23 (Figura 8), além da deleção típica (Tabela 10). A Figura 4 mostra a proporção de casos com deleção entre os serviços das diferentes regiões do país.

**Tabela 10:** Resultados da triagem de microdeleção em 22q11.2.

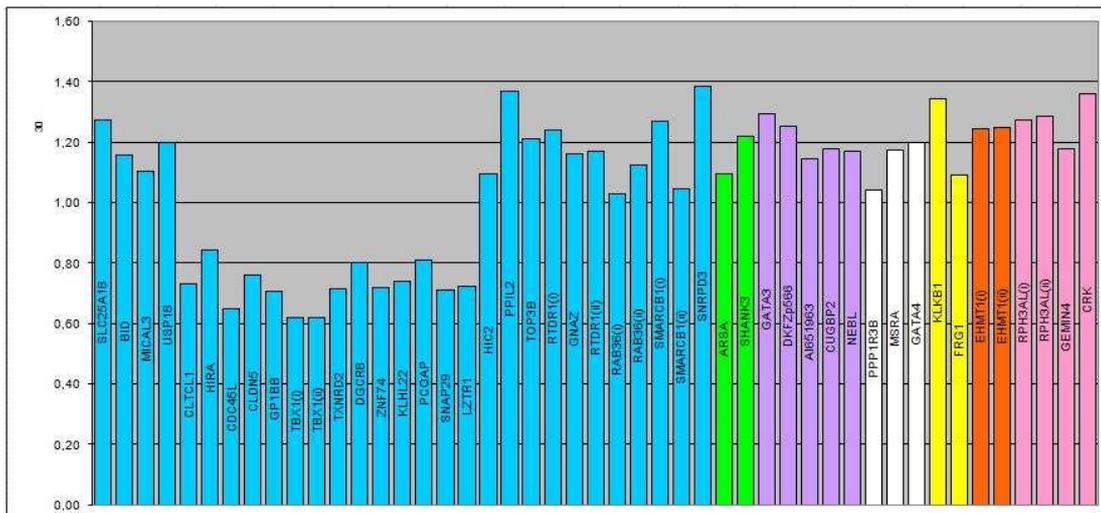
<i>Alteração</i>	<i>Número de indivíduos</i>
del(22)(q11.2q11.2) – 3 Mb	31
del(22)(q11.2q11.2) – 1,5 Mb	03
del(22)(q11.2q11.2) – 3 Mb/ dup(22)(q11.23)	01
dup(8)(p23.1)	01



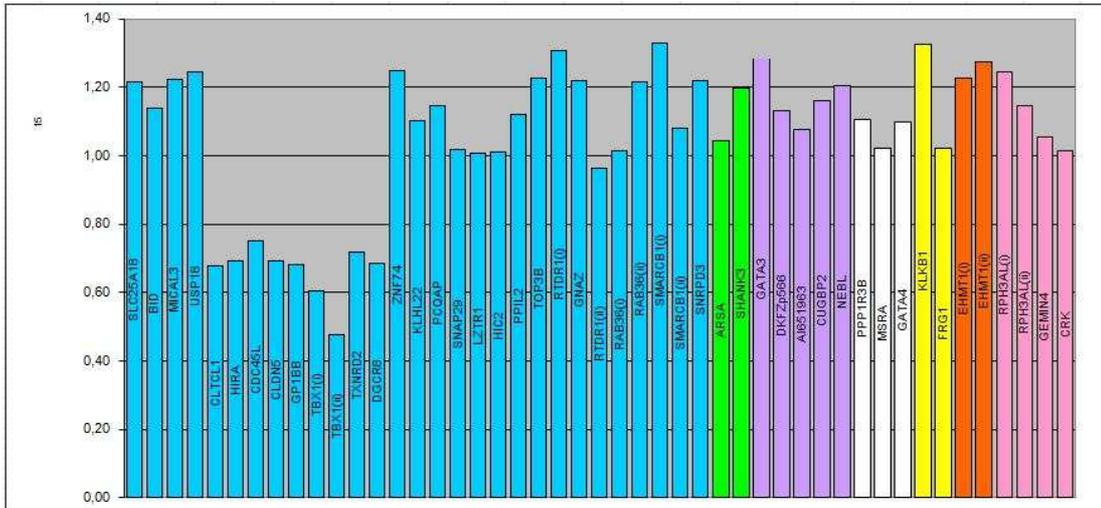
**Figura 4:** Distribuição do número total de amostras encaminhadas de pacientes com e sem deleção, de acordo com a região do país.



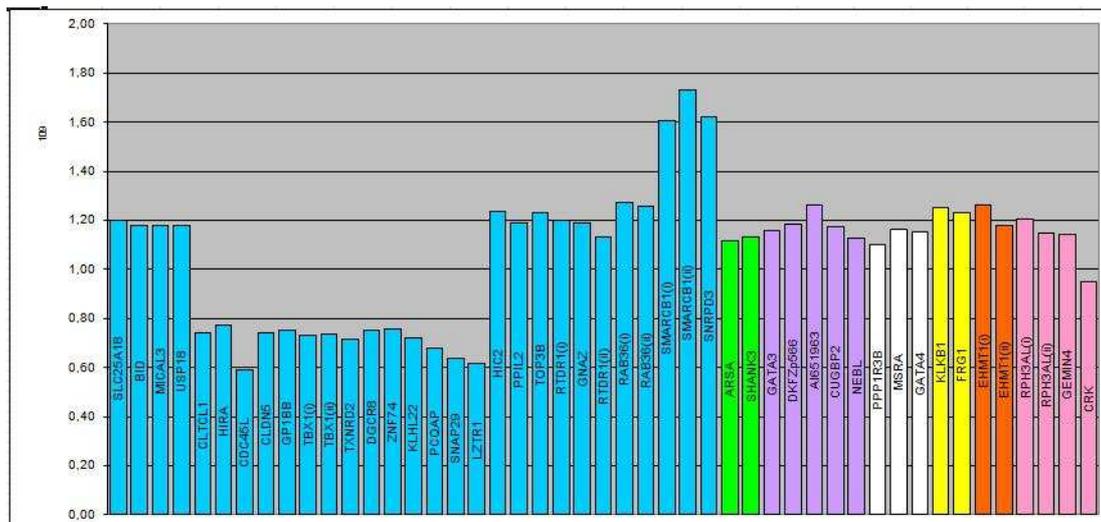
**Figura 5** Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra normal.



**Figura 6** Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção típica de ~ 3 Mb (sondas CLTCL1 a LZTR1).

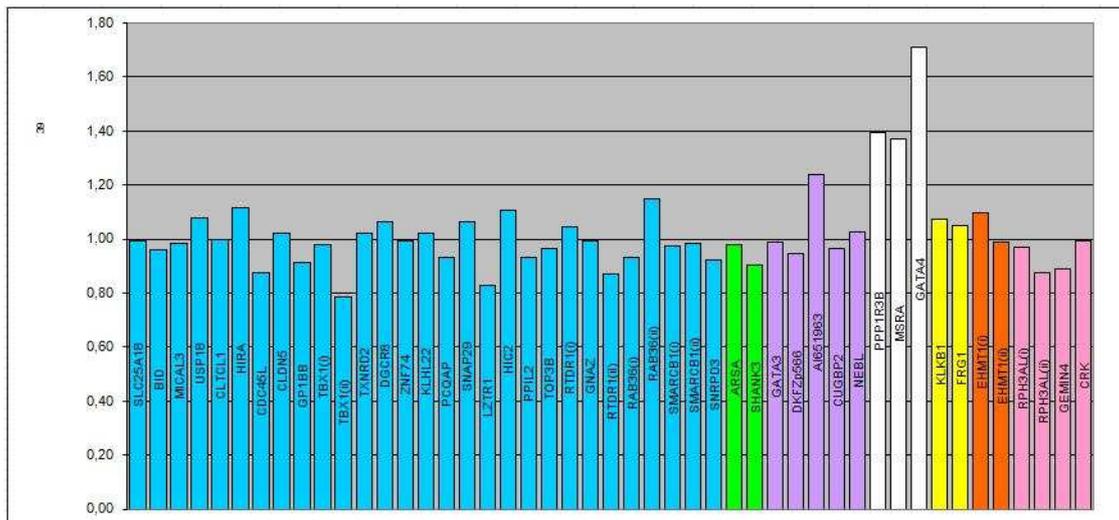


**Figura 7** Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção de ~ 1,5 Mb (sondas CLTCL1 a DGCR8).



**Figura 8** Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com deleção típica de ~ 3 Mb (sondas CLTCL1 a LZTR1) e duplicação em 22q11.23 (sondas SMARCB1 a SNRPD3).

Alteração detectada por MLPA, não envolvendo a região q11 do cromossomo 22, foi encontrada em apenas um paciente – dup(8)(p23.1) (Figura 9) – que também apresentou aberração cromossômica – 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q25q26).



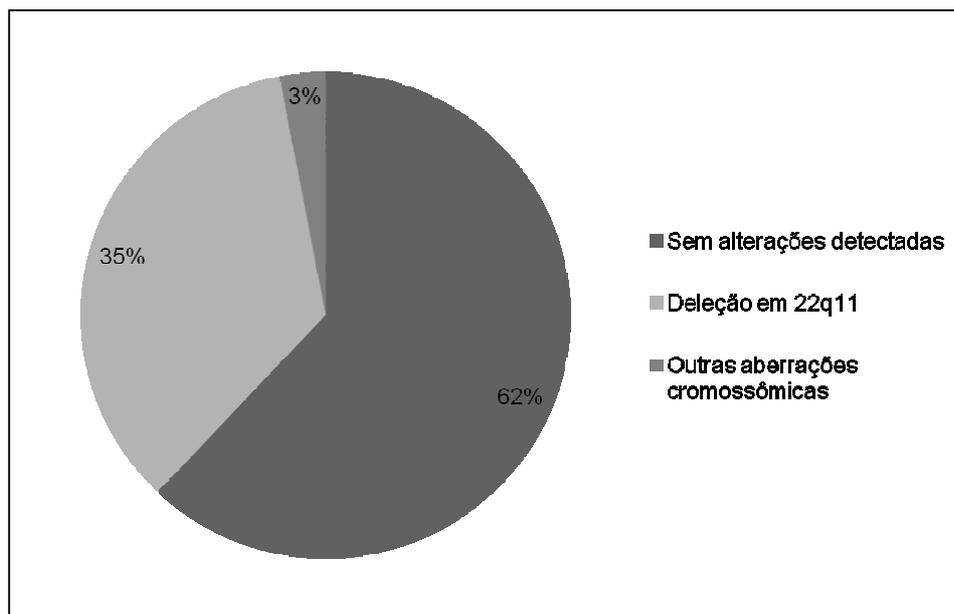
**Figura 9** Gráfico obtido após a análise em planilha específica de Excel, mostrando o resultado de uma amostra com duplicação em 8p23.1 (sondas PPP1R3B a GATA4).

Realizou-se *aGH* para o paciente com duplicação em 8p23.1 identificada por MLPA e cariótipo 46,XY,der(11)ins(11;?) (p13;?). Esta técnica revelou uma duplicação de 3.8 Mb em 8p23.1 [8.129.435-11.934.586 - hg18] e uma duplicação intersticial de 17.09 Mb de q25.2 a q26.3 [81.869.248-98.962.477 - hg18] no cromossomo 15. A partir da análise conjunta do cariótipo e da técnica de *aGH* o cariótipo final deste paciente foi designado como 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q25.2q26.3).arr 8p23.1(8,129,435-11,934,586)x3, 15q25.2q26.3(81,869,248-98,962,477)x3. Deste modo, as características clínicas do paciente foram associadas à trissomia parcial da região p23.1 do cromossomo 8 e à trissomia da região distal do

braço longo do cromossomo 15. O resultado dos exames de cariótipo dos pais foi normal. Com a evolução do indivíduo, o quadro clínico não se manteve sugestivo de Síndrome de deleção 22q11.2.

Também se realizou *aGH* para o caso que apresentou uma deleção típica em 22q11.21 e duplicação em 22q11.23. Esta técnica permitiu a confirmação destas alterações, revelando uma deleção de 2,5 Mb em 22q11.21 [17,256,416-19,795,835 - hg18] e uma duplicação de 1,3 Mb em 22q11.23 [22,020,300-23,394,964 - hg18].

Considerando os resultados de cariótipo e de triagem de microdeleção por MLPA e FISH, obteve-se conclusão diagnóstica em 38% dos casos (Figura 10).



**Figura 10** Frequência de alterações encontradas nos 100 pacientes estudados.

Nos casos em que houve detecção da deleção 22q11.2, foi solicitada amostra dos genitores para investigação. Estas foram recebidas de ambos os genitores em 10 casos e, em três, apenas a

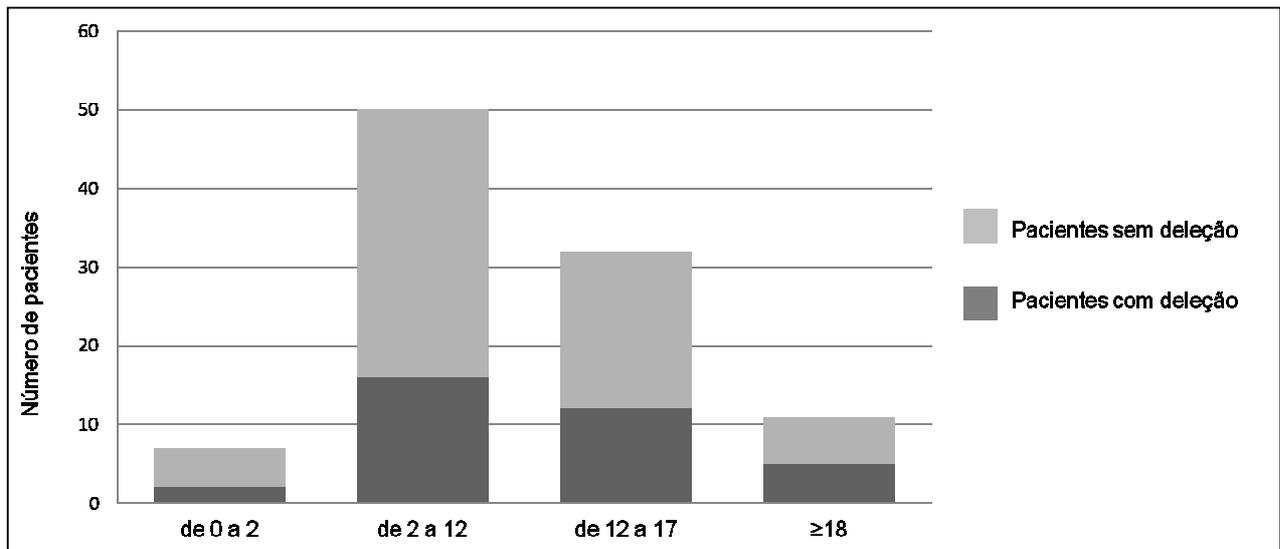
amostra da mãe foi enviada. As análises foram realizadas pela técnica de MLPA e, entre os 13 casos analisados, não foram detectados genitores portadores.

### 5.3. Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11

Quanto ao gênero, entre os pacientes com deleção 15 eram do sexo masculino e 20 do sexo feminino. Entre os pacientes sem deleção, 33 eram do sexo masculino e 32 do sexo feminino. Quanto à idade, foram encaminhados pacientes desde um mês até 33 anos, sendo que a maioria eram crianças ou adolescentes (Tabela 11). A proporção de pacientes com deleção entre as faixas etárias encontra-se na Tabela 11 e na Figura 11.

**Tabela 11:** Distribuição de pacientes com e sem deleção entre as diferentes faixas etárias.

<i>Idade</i>	<i>Pacientes com deleção (n=35)</i>	<i>Pacientes sem deleção (n=65)</i>	<i>Total</i>
<b>Lactente: 0 – 2 anos</b>	02 (29%)	05 (71%)	07
<b>Pré-escolar e escolar: 2 – 12 anos</b>	16 (32%)	34 (68%)	50
<b>Adolescente: 12 – 18 anos</b>	12 (37%)	20 (63%)	32
<b>Adulto: ≥ 18 anos</b>	05 (45%)	06 (55%)	11



**Figura 11** Distribuição de idade dos pacientes com e sem deleção.

Quanto às anomalias palatais, insuficiência velofaríngea foi a alteração mais frequente, sendo observada em 51% e 37% dos pacientes com e sem deleção, respectivamente (Tabela 12). Houve diferença estatisticamente significativa na frequência de FLP entre os pacientes com e sem deleção ( $p=0,02$ ) (Tabela 12).

A frequência de cardiopatia congênita entre os pacientes com e sem deleção encontra-se na Tabela 13. Entre os 100 pacientes incluídos neste estudo, estes dados foram obtidos para 88, pois o restante ainda não tinha o resultado do exame de ecocardiograma. Não houve diferença significativa na frequência e no tipo de cardiopatia congênita entre os pacientes com e sem deleção.

**Tabela 12:** Frequência de anomalias palatais nos pacientes com e sem deleção em 22q11.

<i>Anomalia palatal</i>	<i>Pacientes com deleção (n=35)</i>	<i>Pacientes sem deleção (n=65)</i>	<i>p</i>	<i>Total</i>
Insuficiência velofaríngea	18 (51%)	24 (37%)	0,16	42*
FP	8 (23%)	14 (22%)	0,88	22
FP submucosa	7 (20%)	15 (23%)	0,72	22*
FLP/ FL	1	13 (20%)	<b>0,02</b>	14
Úvula bífida	4 (11%)	12 (18%)	0,36	16

\*Insuficiência velofaríngea e FP submucosa foram confirmadas por nasofibrolaringoscopia em 31 e 16 pacientes, respectivamente.

**Tabela 13:** Frequência de cardiopatia congênita em 30 pacientes com deleção e 58 pacientes sem deleção em 22q11, que realizaram o ecocardiograma.

<i>Cardiopatia congênita</i>	<i>Pacientes com deleção (n=30)</i>	<i>Pacientes sem deleção (n=58)</i>	<i>p</i>	<i>Total</i>
Com cardiopatia	18/30 (60%)	25/58 (43%)	0,13	43/88
Defeito de septo interventricular	8/30 (27%)	8/58 (14%)	0,14	16/88
Anomalias conotruncais/ Tetralogia de Fallot	2/30 (7%)	5/58 (9%)	1,00	7/88
Defeito de septo interatrial/ CIA	4/30 (13%)	4/58 (7%)	0,44	8/88
Outros	4/30 (13%)	8/58 (14%)	1,00	12/88

A Tabela 14 descreve os dismorfismos faciais encontrados nos pacientes com e sem deleção. Apenas para parte dos casos (34) o geneticista clínico que atendeu o paciente afirmou se este possuía ou não face característica. Considerando estes 34 casos, houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,04$ ) entre os pacientes com ou sem deleção e face característica. Também houve

diferença significativa para a presença de face alongada ( $p=0,01$ ) e queda palpebral ( $p=0,01$ ). A diferença na frequência destes sinais se manteve significativa quando analisados em conjunto (face alongada + queda palpebral;  $p=0,01$ ). Além disso, também houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com ou sem deleção que apresentaram de zero a dois distúrbios faciais ( $p=0,004$ ), ou que apresentaram três ou mais distúrbios faciais ( $p=0,004$ ) (Tabela 14). O número médio de distúrbios faciais apresentados pelos pacientes com deleção foi 2,9 e sem deleção 2,2.

O desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental foi descrito como alterado em todos os pacientes com deleção e em 86% dos pacientes sem deleção (Tabela 15). Encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre a frequência de atraso ou distúrbio de linguagem ( $p=0,02$ ) e dificuldade de aprendizagem ( $p=0,01$ ) entre os pacientes com e sem deleção (Tabela 15).

A frequência dos demais sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção está descrita na Tabela 16. Encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas para a presença de hipoacusia condutiva ( $p=0,02$ ), sendo que essa foi encontrada nesta amostra com o dobro de frequência nos pacientes com deleção. Este sinal clínico foi encontrado em 13/31 pacientes com deleção (5/13 também com FP) e em 11/58 pacientes sem deleção (6/11 também com FP ou FLP). Quando comparadas as frequências, não foi encontrada associação significativa entre a presença de hipoacusia condutiva e FP ou FLP ( $p=0,19$ ).

**Tabela 14:** Frequência de dismorfismos faciais nos pacientes com e sem deleção em 22q11.

<i>Dismorfismos faciais</i>	<i>Pacientes com deleção</i>	<i>Pacientes sem deleção</i>	<i>P</i>	<i>Total</i>
<i>Face característica</i>				
Sim	13 (37%)	16 (25%)	<b>0,04</b>	29
Não	2 (6%)	13 (20%)	-	15
Sem resposta	20 (57%)	36 (55%)	-	56
Orelhas baixas/ dismórficas	17 (49%)	29 (45%)	0,70	46
Face alongada	27 (77%)	33 (51%)	<b>0,01</b>	60
Hipertelorismo	5 (14%)	14 (22%)	0,38	19
Queda palpebral	19 (54%)	17 (26%)	<b>0,01</b>	36
Nariz típico	24 (69%)	39 (60%)	0,40	63
Microcefalia	9 (26%)	9 (14%)	0,14	18
Face alongada + nariz típico + queda palpebral	11 (31%)	12 (18%)	0,14	23
Face alongada + queda palpebral	16 (46%)	14 (22%)	<b>0,01</b>	30
Face alongada + nariz típico	21 (60%)	27 (42%)	0,08	48
<i>Número de dismorfismos faciais</i>				
0 – 2	11 (31%)	40 (62%)	<b>0,004</b>	51
3 – 6	24 (69%)	25 (38%)	<b>0,004</b>	49

**Tabela 15:** Frequência de alterações no desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental nos pacientes com e sem deleção em 22q11.

<i>Desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental</i>	<i>Pacientes com deleção</i>	<i>Pacientes sem deleção</i>	<i>P</i>	<i>Total</i>
Alterado	35/35 (100%)	55/64 (86%)	-	90/99
RDNPM	19/35 (54%)	34/64 (53%)	0,91	53/99
Atraso/Distúrbio de linguagem	20/35 (57%)	21/64 (33%)	<b>0,02</b>	41/99
Dificuldade de aprendizagem	27/35 (77%)	32/64 (50%)	<b>0,01</b>	59/99
Distúrbio de comportamento	14/35 (40%)	20/64 (31%)	0,38	34/99

**Tabela 16:** Frequência de sinais clínicos nos pacientes com e sem deleção em 22q11

<i>Características clínicas</i>	<i>Pacientes com deleção</i>	<i>Pacientes sem deleção</i>	<i>p</i>	<i>Total</i>
Alterações imunológicas	18/29 (62%)	24/52 (46%)	0,17	42/81
Hipocalcemia	-	1	-	1/81
Baixa estatura	8/32 (25%)	24/63 (38%)	0,20	32/95
Hipoacusia neurosensorial	3/31 (10%)	6/58 (10%)	1,00	9/89
Hipoacusia condutiva	13/31 (42%)	11/58 (19%)	<b>0,02</b>	24/89
Alterações oftalmológicas	12/29 (41%)	19/53 (36%)	0,62	31/82
Alterações neurológicas	8/23 (35%)	9/39 (23%)	0,32	17/62
Alterações de trato urinário	4/30 (13%)	6/55 (11%)	0,74	10/85
Alterações do sistema gastrointestinal	12/33 (36%)	21/63 (33%)	0,77	33/96
Refluxo gastro-esofágico	8/33 (24%)	11/63 (17%)	0,43	19/96
Dificuldade alimentar	10/32 (31%)	25/63 (40%)	0,42	35/95
Alterações esqueléticas	11/32 (34%)	25/59 (42%)	0,46	36/91

#### **5.4. Cálculo de custos**

Uma estimativa de custos para cada procedimento, incluindo apenas insumos de laboratório, é descrita na Tabela 17. O custo total estimado, incluindo coleta, transporte de amostras e insumos laboratoriais necessários, foi de R\$64,73 para cariótipo, R\$258,71 ou R\$140,23 (utilizando o protocolo adaptado) para FISH, R\$262,21 (utilizando o protocolo indicado pelo fabricante) ou R\$143,73 (utilizando o protocolo adaptado) para cariótipo + FISH e R\$158,23 para MLPA. Não considerando os custos de coleta e transporte, o valor total em insumos de laboratório foi de R\$27,50 para cariótipo, R\$221,48 (utilizando o protocolo indicado pelo fabricante) ou R\$79,00 (utilizando o protocolo adaptado) para FISH, R\$224,98 (utilizando o protocolo indicado pelo fabricante) ou R\$106,50 (utilizando o protocolo adaptado) para cariótipo + FISH e R\$121,00 para MLPA. Estimou-se que o custo com recursos humanos seria de R\$182,80 para cada diagnóstico, incluindo todas as técnicas utilizadas neste trabalho.

**Tabela 17:** Custos da investigação de deleção em 22q11.

<i>Procedimento</i>	<i>Valor por paciente</i>	
Coleta de amostras	R\$ 2,23	
Transporte de amostras	De R\$ 20,00 a R\$ 50,00 (dependendo do local)	
Cultura de linfócitos	R\$ 24,00	
Bandamento G	R\$ 3,50	
FISH	R\$ 197,48/ R\$79,00*	
Extração de DNA	R\$ 21,00	
MLPA	R\$ 100,00	
	<i>Valor sem coleta e transporte</i>	<i>Valor incluindo coleta e transporte</i>
Cariótipo	R\$ 27,50	R\$64,73
FISH	R\$ 221,48/ R\$79,00*	R\$258,71/ R\$140,23*
Cariótipo + FISH	R\$ 224,98/ R\$106,50*	R\$262,21/ R\$143,73*
MLPA	R\$ 121,00	R\$158,23

\*Valor com protocolo adaptado.

### **5.5. Comparação das técnicas utilizadas e recebimento de amostras para investigação**

Ambas as técnicas utilizadas neste trabalho possuem vantagens e desvantagens. A Tabela 18 reúne as principais características de cada uma. Com relação à qualidade da amostra necessária, considerou-se a qualidade da preparação cromossômica e a qualidade do DNA que são necessários para a realização com sucesso de suas respectivas técnicas. Para o número de etapas necessárias, considerou-se para FISH as seguintes etapas: incubação das amostras, preparação cromossômica, preparação das lâminas, pré-tratamento e hibridação, lavagem pós-hibridação e análise; e para MLPA: extração de DNA (realizada em duas etapas), quantificação do DNA, diluição das amostras e

hibridação, ligação, PCR, diluição e preparação das amostras para leitura em sequenciador automático, leitura em sequenciador automático e análise dos resultados.

Quanto ao tempo necessário para o diagnóstico foi considerado o tempo mínimo em que é possível ter um resultado através destas técnicas, a partir do recebimento da amostra de sangue, de acordo com os métodos utilizados neste trabalho. Para MLPA, neste caso, não foi considerada a necessidade de juntar amostras para otimização de custos.

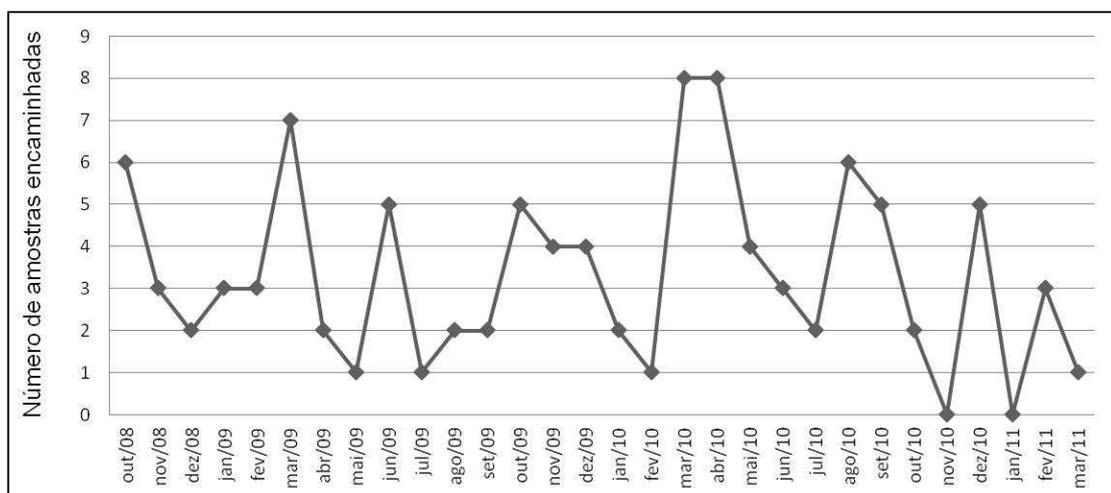
**Tabela 18:** Características das técnicas de FISH e MLPA.

<i>Características</i>	<i>FISH</i>	<i>MLPA</i>
Tipo de amostra utilizada	Linfócitos cultivados	DNA
Qualidade da amostra necessária	De razoável a boa	Boa
Número de <i>loci</i> testados por reação	Um	Até 48
Número de amostras processadas em uma reação	Individual	De 10 a 95
Número de etapas necessárias	Seis	Nove
Complexidade dos procedimentos	Alta	Alta
Sensibilidade	Alta	Alta
Especificidade	Alta ( <i>locus</i> específica)	Alta (várias sondas em 22q11)
Tempo necessário para diagnóstico	3 – 4 dias	3 – 4 dias
Equipamentos necessários	Equipamentos básicos + microscópio de fluorescência equipado com filtros adequados	Equipamentos básicos + termociclador + sequenciador
Custo de insumos	R\$221,48/ R\$79,00*	R\$121,00

\*Valor com protocolo adaptado.

A maioria das instituições participantes optou pelo envio das amostras por serviço expresso de postagem (Sedex<sup>®</sup>). Apenas duas instituições utilizaram o serviço de *courrier* (Varig Log<sup>®</sup> ou Azul Cargo<sup>®</sup>). Três instituições tiveram dificuldades no envio de amostras, quer por impossibilidade de envio por serviço expresso de postagem através da instituição onde atendiam, quer por atraso e má organização das empresas de transporte local que ofereciam serviço de *courrier*. Entre as 100 amostras encaminhadas, poucas tiveram atraso na entrega e em nenhum caso isso impossibilitou a realização das técnicas de FISH e MLPA.

A Figura 12 mostra o número de amostras recebidas mensalmente durante os 30 meses em que estas foram encaminhadas, sendo este número bastante irregular. Houve apenas dois meses em que nenhuma amostra foi recebida e o número máximo de amostras recebidas em um mesmo mês foi oito. O tempo médio para envio de resultado foi de um mês para cariótipo e FISH e três meses para MLPA.



**Figura 12** Distribuição do número de amostras recebidas mensalmente durante os 30 meses de estudo.



*DISCUSSÃO*

---



## 6. Discussão

As investigações em genética médica dispõem, atualmente, de uma extensa gama de técnicas que permitem desde a identificação de aberrações cromossômicas até alterações em um único par de bases do DNA. Entretanto, a aplicação da genética para cuidados de saúde não é tão simples, de maneira geral. É muito complexo estabelecer relevância de determinados procedimentos laboratoriais na saúde pública pela diversidade de doenças e respectivas heterogeneidades clínicas.

O sistema de saúde brasileiro é predominantemente público, sendo o SUS responsável pelo custeio em saúde de cerca de 80% da população. O sistema de saúde vigente no Brasil tem na universalidade, equidade e integralidade seus princípios orientadores [18, 80]. Segundo Cecílio (2001) [81], esses princípios estão tão profundamente entrelaçados que chegam a configurar um tríplice-signo segundo o qual não há integralidade e equidade sem que a universalidade de acesso esteja garantida.

Como já mencionado, a discussão formal sobre o estabelecimento de uma política pública de saúde em genética no Brasil foi iniciada em outubro de 2004, com a instituição do Grupo de Trabalho de Genética Clínica [11] e resultou, quatro anos depois, na publicação da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica [12], ainda não regulamentada. Um dos objetivos desta portaria é o de incentivar a realização de pesquisas e projetos estratégicos destinados ao estudo de custo-efetividade, eficácia e qualidade e incorporação de tecnologias na área de genética clínica.

Os desafios para a implantação da genética médica no sistema de saúde brasileiro ainda são muitos e não incluem apenas o alto custo das novas tecnologias para diagnóstico molecular. As dificuldades estão desde o atendimento primário dos pacientes, já que o embasamento teórico e treinamento prático em genética para profissionais da saúde é bastante limitado. Por exemplo, em

estudo preliminar do PCFB envolvendo 80 profissionais atuantes em programas de saúde da família, observou-se despreparo dos profissionais da atenção básica para atuação em genética [82]. Além disso, a maioria dos serviços situa-se em grandes regiões metropolitanas, principalmente no sul e sudeste, e faltam profissionais habilitados para atender à demanda existente [20, 24].

Por outro lado, em uma parte significativa de centros de atendimento em que profissionais habilitados atuam há vários anos, não existe suporte laboratorial básico em genética. Desta maneira, é necessário encaminhar amostras para diagnósticos para fora das respectivas unidades no mesmo ou em outro estado do país [13].

Entre as anomalias congênitas, as FOTs compreendem os defeitos congênitos mais frequentes, reconhecidos como problema de saúde pública. O seguimento de pessoas com FOTs compreende investigação diagnóstica específica, tratamento por equipe multiprofissional e aconselhamento genético. Um dos trabalhos do PCFB, que avaliou a inserção da genética clínica na RRTDCF, encontrou que entre 25 centros credenciados à RRTDCF, apenas 13 possuem geneticista clínico e 15 mencionaram a necessidade de encaminhar pacientes a outros serviços para uma avaliação genética completa (principalmente análise citogenética e molecular) [14].

O presente estudo foi concebido e iniciado no contexto da reflexão da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica e fecha um ciclo importante de estudos do PCFB, relacionados ao reconhecimento de diferentes aspectos da atenção à saúde em FOTs no Brasil, visando a proposição de estratégias efetivas de incremento da atenção à saúde na área [83, 84, 85, 86, 87].

Neste contexto, este trabalho procurou trazer à luz situações práticas da atenção em genética laboratorial e contribuir para a otimização de estratégias diagnósticas na saúde pública no Brasil, por meio da implantação e da avaliação do funcionamento, durante 30 meses, de um centro de referência

de diagnóstico laboratorial de pacientes com anomalias palatais e suspeita de Síndrome de deleção 22q11.2.

A escolha desta condição clínica como modelo baseou-se na organização do sistema de atenção à saúde terciário para indivíduos com FOTs no SUS (RRTDCF), na constatação da necessidade de encaminhar pacientes das unidades da RRTDCF para avaliação genética completa (principalmente análise citogenética e molecular) em estudo prévio do PCFB, na prevalência da Síndrome de deleção 22q11.2 entre indivíduos com fendas orais e nas diferentes técnicas atualmente empregadas para seu diagnóstico [6, 14, 27, 67].

### **6.1. Disponibilidade do diagnóstico laboratorial para Síndrome de deleção 22q11.2 nas instituições participantes deste trabalho**

Com relação à disponibilidade de exames complementares, foram relatadas poucas dificuldades na realização dos exames complementares necessários para avaliação dos pacientes, sendo que até mesmo os exames de nasofibrolaringoscopia e ressonância magnética de crânio não estavam disponíveis em apenas três e quatro centros, respectivamente. Entretanto, esta estimativa considerou apenas o acesso ou não aos exames complementares. Foram observadas algumas dificuldades, principalmente a demora para a realização destes exames, sendo que para o exame de ecocardiograma, por exemplo, não foi conhecido o resultado em 12 pacientes, até o encerramento deste estudo.

Para os exames de nasofibrolaringoscopia, ecocardiograma e ressonância magnética de crânio, que tinham verba orçamentária deste estudo para a realização em clínicas da rede privada, a

maioria dos médicos geneticistas participantes teve dificuldade em estabelecer fluxo entre pacientes e o serviço. Os motivos foram: faltas em consulta médica agendada na qual o pedido seria fornecido, dificuldade de transporte do paciente até o serviço, ausência de estrutura de serviços individuais para convocar o paciente e, em boa parte dos casos, necessidade de sedação para exame. Além disso, alguns médicos, em vista das justificativas acima, optaram por solicitar os exames na própria instituição onde atendem, ou em outras instituições que fazem os exames através do SUS, visando minimizar os transtornos para o paciente e aguardando o fluxo natural do sistema de saúde, que tem melhorado o acesso ao usuário, de modo geral [19].

Muitas condições geneticamente determinadas, assim como Síndrome de deleção 22q11.2, apresentam comprometimento em diferentes órgãos e sistemas, com necessidade de atendimento multidisciplinar e com avaliações e exames de diferentes especialidades, antes que uma hipótese diagnóstica seja apontada. Assim, o sucesso do atendimento em genética, muitas vezes, torna-se dependente dos demais profissionais e da infraestrutura de saúde disponível. Entretanto, entre essas variáveis, nada indica que isso seja diferente do que ocorre com outras especialidades médicas. Mesmo com acesso a exames gerais e complementares, a dificuldade de atendimento por médico geneticista pode dificultar a interpretação completa e holística dos resultados e, assim, a conclusão diagnóstica. Este fato certamente é agravado pelo desconhecimento dos profissionais da saúde sobre genética médica e clínica [20, 24, 88].

Também foram apontadas dificuldades no envio de amostras por três instituições. O desenho deste estudo previu que o transporte das amostras para exames fosse realizado por transportadoras contratadas que têm este serviço discriminado. Porém, apenas três instituições participantes

utilizaram este serviço e houve atrasos na coleta e entrega em uma localidade e, em algumas cidades o serviço foi descontinuado pela empresa.

Apesar de não ser a estratégia proposta neste estudo, a grande maioria dos serviços optou pelo envio por serviço expresso de postagem, sendo a principal justificativa a facilidade deste tipo de envio por poder utilizar o sistema das próprias instituições de despacho para os correios. Contudo, esta não é uma realidade em todos os serviços, sendo que dois apontaram a necessidade de despacho e pagamento nos correios pelo médico geneticista ou pelo próprio paciente. Ressalta-se que os correios não aceitam a postagem de remessas onde se declara o conteúdo como material biológico para análise clínica-laboratorial, tais como: plasma, sangue e hemoderivados e componentes (órgãos, tecidos humanos, etc.) (<http://www.correios.com.br/Produtosaz/Complementos/NaoTransportamos.cfm>).

Apesar desta restrição dos correios, há poucos serviços privados que permitem o transporte de material biológico no país, sendo que, neste trabalho foram observados problemas na utilização destes serviços, como citado anteriormente. Estas dificuldades apontam para a necessidade de organização do sistema de envio de amostras, incluindo o estabelecimento de fluxo de acordo com normas de vigilância sanitária para envio de amostras biológicas no país.

Para as amostras que necessitam de cultivo celular precisa-se atentar para os dias da semana de encaminhamento e prazos de entrega. Este cuidado deve ser tomado especialmente para as amostras encaminhadas para o exame de cariótipo, que deve ser iniciado até quatro dias após a coleta do sangue [89]. A comunicação entre os profissionais envolvidos e o planejamento adequado de cada remessa de material é fundamental nesta situação. Notou-se neste trabalho, que para algumas regiões do país, a entrega do material no laboratório de destino em tempo hábil para o cultivo de linfócitos

necessita de muita atenção tanto dos profissionais que encaminham como dos profissionais que recebem a amostra, exigindo cronograma específico.

Ainda com relação ao envio de amostras, cinco centros relataram ter pacientes para os quais não puderam encaminhá-las, sendo os principais motivos o não comparecimento à consulta agendada e a dificuldade na reconvocação de pacientes atendidos anteriormente à disponibilidade do exame. Isto reflete a realidade de saúde de modo geral. Quanto ao não comparecimento em consultas agendadas, isto poderia ser atribuído a motivos econômicos e geográficos, incluindo a distância e falta de transporte dos pacientes das cidades de origem até os centros de atendimento. Estes aspectos já foram apontados em trabalhos anteriores do PCFB [35, 90]. No trabalho realizado por Fontes e colaboradores (2012) [90], entre 23 pacientes portadores de FOTs do estado de Alagoas, aos quais foi oferecido atendimento com equipe especializada no tratamento destes defeitos congênitos, apenas 9 (39,1%) compareceram à consulta agendada.

Outro aspecto importante com relação à busca e frequência nos serviços de saúde é a escolaridade dos pais ou responsáveis pelos pacientes, o que pode influenciar no reconhecimento e entendimento da necessidade de atendimento e seguimento. Entretanto, em uma avaliação geral no uso de serviços de saúde no Brasil verificou-se que a renda influenciou mais o acesso do que a escolaridade. Em particular, a renda mostrou-se fator importante no acesso aos serviços de saúde das crianças [19].

Ainda, o local de residência do usuário afeta o acesso a serviços de saúde, que melhora com o grau de desenvolvimento socioeconômico da região [19]. Os residentes nas regiões Sudeste e Sul tiveram maior acesso do que os residentes nas outras regiões. Esta realidade também se refletiu no

número de amostras encaminhadas de acordo com a região do país, no presente trabalho, o que será novamente discutido nesta seção.

Especificamente sobre atendimento em genética clínica, seria apropriado o envolvimento de agentes de saúde e serviço social locais, com um treinamento mínimo em genética, para melhoria do acesso de população menos favorecida a este tipo de serviço.

Com relação à dificuldade na reconvocação de pacientes atendidos anteriormente, seria útil a formação de bancos de dados locais efetivos para caracterização da necessidade de investigação complementar em genética, quando exames específicos não estão disponíveis na época do atendimento.

Quanto aos exames laboratoriais disponíveis, cinco instituições apontaram a não disponibilidade do exame de cariótipo. Este exame foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana/ UNICAMP para cinco instituições, três do nordeste e duas do sul.

O cariótipo é a técnica mais antiga, presente em maior número de centros e útil para diversas situações clínicas em genética. Este está sugerido entre os exames mínimos pela portaria de inclusão da genética no SUS e as instalações requeridas para sua realização exigem equipamentos laboratoriais rotineiramente presentes em laboratórios de análises clínicas, exigindo poucas adaptações. Apesar de não ser a técnica adequada para o diagnóstico de deleção em 22q11, esta é a alternativa viável para afastar outras aberrações cromossômicas dentro da realidade atual do sistema público de saúde brasileiro. Considerando estratégias em saúde, este exame, apesar de ter substituído mais moderno e tecnológico – os *microarrays* genômicos – ainda é conclusivo em uma série de condições genéticas.

Mesmo sendo um exame de importante utilidade na avaliação genética e um dos únicos exames de genética incluídos na Tabela Unificada de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS, a falta de acesso ao exame de cariótipo já foi apontada em trabalhos anteriores [13, 14] e ainda é um desafio aos serviços de genética em alguns estados do país, principalmente no norte e nordeste, onde os laboratórios de citogenética são escassos ou inexistentes. Além disso, para os serviços existentes, tanto públicos como privados, falta regulamentação específica quanto aos aspectos de controle de qualidade e recursos humanos com habilitação adequada.

Iniciativas para estabelecer guias de recomendações específicos para laboratórios de citogenética poderiam ser tomadas pelas Sociedades Brasileiras de Genética e Genética Médica, como ocorre nos Estados Unidos e na Europa, onde o Colégio Americano de Genética Médica e a Associação Européia de Citogenética são responsáveis pela publicação destes documentos. Um exemplo de controle de qualidade específico para laboratórios de citogenética é o oferecido pelo Colégio Americano de Patologia (CAP). A SBG, por meio de um comitê de normatização e recomendações para procedimentos utilizados em laboratórios que prestam serviços na área de genética humana, disponibilizou em sua página na internet, um Guia de Boas Práticas Laboratoriais em Citogenética e Genética Molecular Humana. Este, atualmente, está em revisão, sem disponibilidade para acesso eletrônico na página da SBG. Este ano, por iniciativa de citogeneticistas, está em processo de fundação a Associação Brasileira de Citogenética (ABRACITO) (Farah, comunicação pessoal).

Devido às características do exame de cariótipo, cujas análises são individuais, que demandam profissionais treinados por longo período, a implantação deste serviço em algumas

regiões é difícil. Por outro lado, considerando este como um exame básico, de ampla aplicação em genética médica, e suas características técnicas, seria adequado que o encaminhamento de amostras para cariótipo fosse regionalizado, para laboratórios com demandas limitadas, e não concentrado em poucos laboratórios, evitando grandes demandas, o que poderia trazer prejuízos à qualidade do exame.

Para a investigação de microdeleções a técnica de FISH foi citada como disponível por quatro centros, a técnica de MPLA também por quatro centros e outros métodos moleculares por dois centros. Apesar de todas as técnicas necessitarem de formação especializada, notou-se que a técnica de MLPA teve implantação muito mais rápida que a de FISH, considerando que a técnica de MLPA foi descrita em 2002 e FISH em 1986. Isto ocorre principalmente devido às particularidades destas técnicas, visto que FISH requer treinamento especializado, intenso e longo e as técnicas moleculares necessitam habilidades mais simples, aprendidas mais rapidamente.

Quanto à infraestrutura, devido ao grande desenvolvimento da biologia molecular nos últimos anos, a presença de centros equipados para a realização dessas técnicas tende a ser maior que aqueles com condições para realizar citogenética molecular (FISH). Deste modo, a tendência é que a diferença de infraestrutura entre instituições de pesquisa de diferentes regiões do país seja cada vez menor para estas técnicas.

Os fatos expostos acima poderiam apontar, a longo prazo, para a utilização de técnicas apenas moleculares como uma alternativa mais rápida de ser implantada, porém não afastaria a necessidade de cariótipo, pois estas técnicas permitem testar apenas regiões específicas, e não permitiriam excluir outras aberrações cromossômicas.

Uma alternativa que contemplaria as duas possibilidades de investigação em um único experimento seria a utilização da tecnologia de *aGH*, que permite uma análise genômica com resolução muito maior do que o exame de cariótipo. Porém, estas ainda têm custo muito elevado no Brasil, tanto em infraestrutura como em insumos laboratoriais, e o acesso ainda é restrito, mesmo em serviços privados. Portanto, não foi levada em conta na análise dos métodos disponíveis nas instituições. Em vista do custo e eficiência das diferentes técnicas, há um estudo brasileiro recente abordando a agregação de diferentes tecnologias laboratoriais para diagnóstico [75].

O diagnóstico de microdeleções cromossômicas, incluindo a deleção em 22q11, no serviço público de saúde no Brasil só ocorre, até o momento, com a participação dos pacientes em projetos de pesquisa, pois não há cobertura do SUS para tais exames. Dois dos serviços deste estudo serviços relataram já ter tido este exame disponível temporariamente com recursos de assistência.

Existem pelo menos quatro centros de pesquisa em genética no país que já realizaram trabalhos com a Síndrome de deleção 22q11.2, incluindo o diagnóstico laboratorial [53, 70, 74, 75]. Todos estes centros estão no sul e sudeste e a disponibilidade do diagnóstico encerra-se com o término do projeto. Na grande maioria das vezes, isso ocorre devido ao término dos recursos financeiros e também à falta de manutenção dos profissionais na instituição, que são principalmente alunos de pós-graduação. Deste modo, sete serviços participantes deste trabalho já tiveram em algum momento a investigação de deleção em 22q11 disponível na própria instituição ou em outra que aceitava receber amostras.

Nota-se que o diagnóstico de deleção em 22q11, quando disponível no setor público, na maioria das vezes só era possível no âmbito da pesquisa científica, apontando para uma necessidade de saúde regulando a pesquisa científica. Ainda, a presença temporária de exames reforça a

desigualdade entre os usuários com mesma necessidade. A descontinuidade do diagnóstico conforme término de projetos de pesquisa aumenta a iniquidade entre os indivíduos que necessitam do diagnóstico, ficando estes na dependência dos interesses científicos e possibilidades das instituições onde são atendidos.

Além disso, a vinculação do diagnóstico à pesquisa científica acentua as desigualdades regionais de acesso, sendo que a maioria dos centros de pesquisa que já fez este diagnóstico situa-se nas regiões Sul e Sudeste. Os sete centros participantes que mencionaram ter acesso a este diagnóstico em algum momento são das regiões Sul e Sudeste, nenhum centro do Nordeste mencionou acesso anterior.

O diagnóstico por meio de pesquisas científicas, na maioria das vezes é realizado com recursos humanos temporários (alunos de pós-graduação), o que contribui para a descontinuidade do procedimento. Outra questão é a tendência de repasse do custo de assistência para agências de fomento em pesquisa, quando deveriam ser desenvolvidas estratégias para geração de parâmetros para indicação e gerenciamento da realização de exames pelo serviço de saúde.

Com relação ao número de amostras encaminhadas de acordo com a região do país em que os centros se localizam, pode-se notar diferença entre as regiões, sendo o maior número de amostras encaminhados da região Sul e o menor número da região Nordeste (Figura 4). Considerando que o número de centros entre as diferentes regiões estava bem distribuído, quatro no Sul e Sudeste e três no Nordeste (Tabela 3), o baixo de número de amostras encaminhadas por esta última pode refletir a maior dificuldade de atendimento em genética clínica nesta região, como já apontado em trabalhos anteriores [13, 24, 36].

Alguns centros participantes encaminharam poucas amostras (Tabela 3). Isto pode refletir a dificuldade dos centros em manter uma base de dados de suspeita diagnóstica e, também, de reconvocar pacientes atendidos anteriormente com suspeita clínica de S. del 22q11.2. Geralmente, os atendimentos em serviços de genética clínica têm longos intervalos entre os retornos. Esta poderia ser uma razão pela qual muitos pacientes não completaram a investigação clínica, ou seja, a suspeita de S. del 22q11.2 ainda não havia sido formalizada, por falta de exames ou reavaliação diagnóstica, ou ainda, não tenham sido atendidos durante o período. Por outro lado, como o critério de inclusão foi anomalia palatal e a Síndrome de deleção 22q11.2 é a condição clínica com FP mais frequente, seria esperado um número maior de casos, já que pelo menos três serviços participantes são da RRTDCF. Mesmo assim, justamente por serem serviços especializados, os retornos podem ser mais espaçados.

O serviço que encaminhou o maior número de amostras (33) foi o CAIF (Curitiba, PR). Este é um hospital especializado com represamento de casos com suspeita clínica de Síndrome de deleção 22q11.2 e boa infraestrutura de exames subsidiários, o que permitiu aventar a suspeita clínica e encaminhar rapidamente os casos. O serviço que encaminhou o menor número de amostras (01) foi de Fortaleza (CE), onde há um único geneticista que atende toda a demanda de FOTs no serviço público do estado e há dificuldades de acesso a exames subsidiários. O único centro do Nordeste que encaminhou número significativo de amostras (10) foi de Maceió. Isto ocorreu porque, no período de realização deste trabalho, os geneticistas deste estado fizeram uma força-tarefa, envolvendo diferentes projetos de pesquisa vinculados ao PCFB e que resultaram no atendimento de pacientes com FOTs [90]. Outros centros participantes que encaminharam número muito baixo de amostras atendiam pacientes com anomalias palatais esporadicamente.

## 6.2. Exames laboratoriais

O resultado do cariótipo foi considerado normal em 89 casos, incluindo quatro casos de heteromorfismos cromossômicos, e alterado em quatro. Em sete casos este exame não pode ser realizado porque não foi encaminhada amostra para cultivo de linfócitos ou por falha nesta técnica (Tabela 9).

A deleção em 22q11 foi detectada por esta técnica em apenas um caso. Isto mostra a ineficiência do cariótipo para a detecção desta deleção. Por outro lado, foram encontradas aberrações cromossômicas não envolvendo a região 22q11 em três casos, o que mostra a necessidade de utilização desta técnica para diagnóstico diferencial, devido à grande heterogeneidade clínica observada em deleção 22q11.

A incorporação de um centro de referência laboratorial de genética em instituições de ensino e pesquisa é uma excelente estratégia, pois minimiza custos de infraestrutura e permite a utilização de recursos complementares, caso seja de interesse da família, para completar a investigação e (ou) contribuir em pesquisa. Isso também possibilita mais recursos e experiência profissional para a interpretação e avaliação mais apurada e cuidadosa dos resultados. Em dois casos deste estudo que apresentavam aberração cromossômica realizou-se a técnica de *aGH* como estudo complementar.

Para o paciente com cariótipo 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21), apesar de o resultado do cariótipo já ter permitido conclusão diagnóstica e aconselhamento genético da família, a análise por *aGH* permitiu um refinamento do segmento do cromossomo 15 inserido no cromossomo 9. Verificou-se que a região duplicada do cromossomo 15 era de q21.1 a q22.31 e não de q12 a q21 [91].

Já para o paciente com cariótipo 46,XY,der(11)ins(11;?)(p13;?), a aplicação da técnica de *aGH* foi fundamental para a identificação do segmento inserido no cromossomo 11. Identificou-se uma duplicação de 17.09 Mb de q25.2 a q26.3 do cromossomo 15, sendo que este segmento duplicado estava inserido no cromossomo 11. Esta técnica também confirmou a duplicação em 8p23.1 identificada pela técnica de MLPA. As sondas para esta região estão incluídas no *kit* de MLPA, pois já foram relatados casos com deleção desta região em pacientes com cardiopatias congênicas, especificamente anomalias conotruncais [92], porém este paciente apresentou duplicação ao invés de deleção. O seu fenótipo deve ser associado tanto à duplicação em 8p23.1 como em 15q25-26 e provavelmente esta última é a responsável pela maioria dos sinais clínicos observados no paciente, devido ao tamanho e conteúdo das regiões envolvidas [93].

Embora ambos os pacientes apresentassem características fenotípicas em comum, como cardiopatia congênita, anomalia palatal, dismorfismos faciais e atraso no desenvolvimento, e duplicações em 15q, estas eram de regiões distintas. Com a evolução destes pacientes, o quadro clínico não se manteve sugestivo de Síndrome de deleção 22q11.2. Aqui, nota-se a dificuldade no diagnóstico clínico desta condição clínica, por incluir sinais dismórficos muito comuns e inespecíficos, observados em diversos tipos de aberrações cromossômicas. Desse modo, é esperado encontrar alterações em outras regiões genômicas em pacientes com suspeita de deleção em 22q11.

Em um caso em que se encontrou cromossomo marcador, a paciente não apresenta deleção em 22q11, o que pode reforçar a suspeita de que este marcador seja responsável pelas características clínicas observadas. Entretanto, os genitores ainda não foram investigados e não se pode afirmar que o marcador é responsável pelo fenótipo da paciente, enquanto não se souber a sua origem e se ele

contém ou não genes. A conclusão deste caso depende da análise do cariótipo dos genitores e de estudo complementar com outras técnicas, como *aGH*, que poderão ser realizadas no futuro.

Encontraram-se aberrações cromossômicas não envolvendo o cromossomo 22 em três de 93 casos. Estes casos reforçam a importância de se realizar exame de cariótipo de boa qualidade em casos suspeitos de Síndrome de deleção 22q11.2. Este resultado é semelhante ao de trabalhos realizados anteriormente que encontraram outras aberrações cromossômicas em 1,7% a 3,7% dos pacientes [41, 51, 55].

Encontrou-se deleção em 22q11 em 35% dos pacientes. Considerando que há uma grande variabilidade fenotípica inter e intra-familiar e mais de 100 diferentes sinais clínicos já foram associados a esta condição clínica, a suspeita de Síndrome de deleção 22q11.2 é um desafio clínico devido à ausência de critérios bem definidos. Além disso, não há uma característica clínica única ou um grupo de características clínicas que está presente em todos os indivíduos afetados. Neste estudo, partiu-se da premissa única de que a suspeita foi aventada por médico geneticista, que poderia ter maior experiência na avaliação clínica dismorfológica.

A porcentagem de pacientes com características clínicas da Síndrome de deleção 22q11.2 que realmente apresentam esta microdeleção é muito variável nos diferentes trabalhos realizados, sendo de 10% a 90% (Tabela 2) [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]. Isto se deve aos diferentes critérios de inclusão adotados nos estudos e à sua grande heterogeneidade clínica.

Pode-se notar na Tabela 2 que apenas um trabalho que incluiu 15 pacientes teve uma porcentagem alta de casos com deleção em 22q11, provavelmente porque estes foram muito bem selecionados para inclusão no estudo. Todos os trabalhos que tiveram casuística maior que 100 pacientes, apresentaram menor frequência de casos positivos para deleção em 22q11.

Fica clara a diferença de distribuição de casos com deleção de acordo com as diferentes regiões do país de onde foram encaminhados (Figura 4). Entre as amostras encaminhadas da região Sul a frequência de deleção foi de 48% e da região Nordeste foi de 13%. Isso pode refletir novamente as dificuldades do sistema de saúde e do atendimento em genética clínica, incluindo o acesso a especialista e exames complementares, da região Nordeste. Quanto à menor frequência de deleção nos casos do Sudeste, se comparado à região Sul, isto poderia ser devido à maior oferta deste diagnóstico nesta região, pois todos os centros desta região relataram ter acesso ao diagnóstico de deleção em 22q11. Deste modo, um maior número de pacientes com suspeita de deleção poderia ser testado, com o objetivo de exclusão desta alteração.

Quanto aos tipos de deleção encontrados em 22q11, 91% eram deleções de três Mb e 9% deleções de 1,5 Mb, o que está de acordo com a literatura, na qual se aponta que cerca de 85% a 90% dos pacientes com deleção apresentam a deleção típica de 3 Mb [46]. Não foram encontradas deleções atípicas e em um caso com deleção de 3 Mb, encontrou-se também uma duplicação distal a esta região, em 22q11.23.

O paciente no qual foi encontrada esta alteração é do sexo masculino, com nove anos na época do diagnóstico e apresenta características clínicas compatíveis com deleção em 22q11, incluindo cardiopatia congênita (refluxo tricúspide), insuficiência velofaríngea e voz anasalada, orelhas baixas e nariz típico, atraso de linguagem e dificuldade de aprendizagem. Após revisão da literatura, apenas um caso semelhante com deleção e duplicação em 22q11 concomitantes foi descrito anteriormente [94]. A duplicação desta região parece estar associada a sinais clínicos muito leves ou nenhum sinal clínico e as características clínicas observadas no paciente provavelmente são decorrentes apenas da deleção, não tendo a detecção desta duplicação implicação importante do

ponto de vista de diagnóstico. Estudos confirmatórios pela técnica de FISH e investigação dos genitores estão em andamento.

Nos casos em que se encontrou deleção, foram solicitadas as amostras dos genitores, pois cerca de 10% dos casos é herdado de um genitor, em geral, com quadro clínico pouco significativo [95], sendo importante a investigação dos genitores para realização do aconselhamento genético. Quando um dos genitores possui a deleção o risco de recorrência é de 50%, e quando ambos são normais o risco de recorrência considerado no aconselhamento genético é de aproximadamente 1% [95].

Em 10 casos foram enviadas as amostras de ambos os genitores e em três casos apenas a amostra da mãe foi enviada. As análises foram realizadas pela técnica de MLPA e, entre os 13 casos analisados, não foram encontrados genitores portadores. Aqui, novamente notam-se as dificuldades de atendimento e seguimento dos pacientes. Provavelmente os retornos com longos intervalos e a distância de moradia dos pacientes até os centros de atendimento foram motivos que contribuíram para o não encaminhamento de amostras dos genitores.

Com relação ao aconselhamento genético, apesar de os cuidados de saúde serem realizados de acordo com os sinais apresentados pelo paciente, independente da presença ou não de deleção, a conclusão diagnóstica permite que o médico faça um prognóstico mais preciso e orientações quanto a condutas antecipatórias mais específicas. Todos os resultados foram encaminhados aos médicos responsáveis pelos pacientes para que estes, quando pertinente e se desejado pelos pacientes ou pelos seus responsáveis, realizassem o aconselhamento genético.

Ao contrário de outras condições geneticamente determinadas, a Síndrome de deleção 22q11.2 não impossibilita a capacidade reprodutiva de seus portadores, embora um estudo recente

tenha apontado para uma seleção desfavorável na geração de prole para estes indivíduos, especialmente para aqueles do sexo masculino [96]. Entretanto, devido à melhoria das condições de saúde incluindo cirurgias cardíacas, tratamentos específicos para anomalias palatais, assim como outros cuidados que melhoram a qualidade de vida dos pacientes, a proporção de indivíduos com Síndrome de deleção 22q11.2 com possibilidades de procriação pode ser significativa. Deste modo, é importante o oferecimento de aconselhamento genético completo, em que se aborda, ente outros assuntos, o de risco de recorrência de 50% para os indivíduos portadores desta deleção. Neste trabalho, metade dos pacientes com deleção eram adolescentes ou adultos (Tabela 11 e Figura 11), o que traz repercussões sobre a importância do diagnóstico laboratorial para orientações mais precisas sobre os riscos reprodutivos.

Ainda referente à idade, a maioria dos casos encaminhados tinha mais de um ano de idade, predominando o grupo entre um e 11 anos. Este dado mostra que os sinais clínicos nem sempre são evidentes ao nascimento, reforçando a necessidade de seguimento longitudinal de indivíduos com FOTs. A idade de envio da amostra pode refletir a dificuldade de acesso ao especialista e (ou) ao exame especializado. Dado semelhante foi obtido em outros estudos do PCFB [90, Monlleó *et al.*, em redação].

### **6.3. Comparação dos sinais clínicos apresentados pelos pacientes com e sem deleção em 22q11**

Foram observadas diferenças significativas para alguns sinais clínicos. São estes: ausência de FLP/FL, presença de face característica, face alongada, queda palpebral, número de dismorfismos faciais, atraso/ distúrbio de linguagem, dificuldade de aprendizagem e hipoacusia condutiva.

Entretanto, como o fenótipo é extremamente variável, estes sinais podem ser considerados para reforçar a suspeita diagnóstica S. Del 22q11.2, mas não podem ser considerados como critérios de inclusão para investigação de deleção em 22q11. Vale lembrar que não há nenhum sinal clínico específico que esteja presente em todos os indivíduos afetados [45].

Comparando a frequência de alguns sinais clínicos encontrados neste estudo com dados da literatura apresentados na Tabela 1, observou-se que, de um modo geral, as frequências encontram-se dentro do esperado. Nos casos em que as frequências não estão dentro do esperado, isto se deve provavelmente ao pequeno número amostral (35 pacientes) no presente estudo, quando comparado ao estudo citado (906 pacientes) [45].

Considerando que a Síndrome de deleção 22q11.2 é a condição geneticamente determinada mais comum em pacientes com FP, alguns trabalhos conduzidos por diferentes grupos, realizaram a triagem de microdeleção em uma série de pacientes com anomalia palatal, desconsiderando se esses possuíam ou não outros sinais clínicos sugestivos dessa condição clínica. Estes estudos demonstraram um índice muito baixo de casos positivos (0-5%). Alguns autores concluíram que não é justificável a triagem da microdeleção neste grupo de pacientes [9, 65, 97] e apenas um sugeriu que seria viável a triagem em todos os pacientes com FL/P [98].

No presente trabalho, considerando que os pacientes com anomalia palatal e hipótese diagnóstica de Síndrome de deleção 22q11.2 apresentam, além da anomalia palatal, outros sinais clínicos que, em conjunto, sugerem a hipótese diagnóstica, observou-se que a avaliação clínico-dismorfológica com exame físico dirigido, realizado por médico geneticista experiente e muitas vezes em serviço específico de atenção a portadores de FOTs – no qual esta condição clínica é frequentemente considerada como diagnóstico diferencial – permitiu a otimização da indicação do

exame laboratorial. Reforça-se, ainda, que a avaliação clínica especializada foi um diferencial deste estudo, quando comparado com resultados de outros trabalhos [9, 65, 97]. A abordagem sistematizada de indicações de investigação de deleção em 22q11 é um dos objetos de investigação do PCFB, cujos resultados estão em análise.

Encontrou-se diferença estatisticamente significativa para a presença de hipoacusia condutiva ( $p=0,02$ ) entre os pacientes com e sem deleção. Quando analisadas em conjunto, a presença de hipoacusia condutiva e FP ou FLP, entre o grupo total de pacientes com hipoacusia condutiva (24), 11 também apresentavam FP ou FLP. No grupo com deleção e hipoacusia condutiva, cinco pacientes também apresentavam FP, e no grupo sem deleção e hipoacusia condutiva, quatro pacientes apresentavam FP e 2 FLP. Quando comparadas as frequências, não foi encontrada associação significativa entre a presença de hipoacusia condutiva e FP ou FLP ( $p=0,19$ ). Entretanto, esses dados devem ser considerados com reserva, pois a presença de fenda palatal, de modo geral, pode levar a otites crônicas, acarretando deficiência auditiva condutiva [99].

#### **6.4. Cálculo de custos**

Quanto à estimativa de custos para a realização das técnicas utilizadas neste trabalho, considerando os custos com material de coleta, transporte do material e de insumos laboratoriais, o valor para cariótipo + FISH foi de R\$262,21 (utilizando o protocolo indicado pelo fabricante) ou R\$143,73 (utilizando o protocolo adaptado), e apenas para MLPA de R\$158,23.

Para a coleta de material não foram computados recursos humanos. Apesar de este procedimento não diferir dos exames gerais de patologia clínica, este foi um ponto crítico para alguns serviços, que não tinham sequer mão de obra ou estrutura adequada para realizar a coleta. Por

outro lado, pela frequência de exames, este valor poderia ser diluído nos custos de outros procedimentos de coleta realizados nos serviços de atendimento. Também, por ser um procedimento comum e necessário para diversas especialidades clínicas, a disponibilidade de mão de obra e instalações adequadas para coleta deveria ser responsabilidade das instituições onde os pacientes são atendidos.

Também não foram considerados os custos de infraestrutura para a realização dos exames. A aquisição de infraestrutura exclusivamente para investigação de exames genéticos, sem planejamento de qual(is) técnica(s) e para qual(is) doença(s) provavelmente seria um grande empecilho para a implantação deste tipo de exame no sistema público de saúde. Deste modo, neste momento, seria viável a realização do diagnóstico para assistência aos pacientes, utilizando a infraestrutura já disponível em centros de pesquisa, o que foi demonstrado neste trabalho. Especialmente, se for considerado o número de investigações mensais, que ocorreu neste estudo. Entretanto, não se deve descartar a revisão desta estratégia, a partir do momento em que dados epidemiológicos forem mais bem conhecidos na população brasileira.

Os custos com recursos humanos foram estimados em R\$182,80 para cada diagnóstico. Entretanto este valor foi calculado considerando a realização de todas as técnicas utilizadas neste trabalho. Os custos com recursos humanos apenas para a realização de MLPA ou FISH seriam menores do que este valor. Comparando-se com o exame de cariótipo, estas técnicas são menos dispendiosas. De todo modo, o exame de cariótipo não pode ser dispensado na investigação diagnóstica de S. del 22q11.2, por conta das possíveis fenocópias.

A formação de profissionais para a realização do exame de cariótipo é demorada, levando-se pelo menos um ano para que este profissional tenha autonomia na análise citogenética. Além de

requerer capacitação profissional extensa, este exame não é automatizado, requer análise individual, que também é demorada e tem como consequência maior custo com recursos humanos para cada exame realizado.

O exame de cariótipo está atualmente incluído na Tabela Unificada de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS, com valor de R\$32,48, o que é claramente insuficiente para a cobertura de insumos e recursos humanos. Este é um dos exames sugeridos como fundamental na atenção integral proposta pela Política de Genética no SUS. Tendo em vista a necessidade de habilitação específica e a infraestrutura necessária para realização desta técnica, uma alternativa que poderia ser utilizada de imediato seria a utilização de infraestrutura de instituições de pesquisa onde a técnica já está implantada, com a incorporação de recursos humanos com vínculo empregatício com SUS.

Atualmente, com o advento de novas tecnologias, a análise de custo-efetividade é uma importante ferramenta para avaliação dos benefícios gerados com o aumento dos gastos em saúde. Um dos instrumentos para a análise de custo-efetividade é razão custo-efetividade incremental (RCEI) ou “*Incremental Cost Effectiveness Ratio*” (ICER). Entretanto, na situação deste estudo, esta análise não foi pertinente.

#### **6.5. Comparação das técnicas utilizadas e recebimento de amostras para investigação**

Com relação às vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas, a técnica de MLPA requer pequenas quantidades de DNA, porém de boa qualidade. Já para a técnica de FISH, apesar de ser possível a utilização de qualquer célula nucleada, a utilização de linfócitos cultivados é a amostra de

preferência, pela qualidade e possibilidade de se analisar células em metáfase. Deste modo, mesmo quando há limitação de material, ambas as técnicas são eficazes, pois o preparo das amostras pode ser realizado a partir de apenas 1 mL de sangue venoso. Atualmente, para a técnica de MLPA, até mesmo protocolos utilizando amostras de DNA extraídas de sangue em papel-filtro já estão disponíveis [100], porém isto só seria justificável em condições especiais, por impossibilidade de coleta de sangue venoso.

A vantagem da utilização de DNA e não de linfócitos cultivados, é que o processamento das amostras não é tão dependente do tempo de transporte. Por outro lado, considerando-se o cariótipo como exame fundamental para a investigação diagnóstica em S. del 22q11.2, as mesmas amostras utilizadas para este exame podem ser também utilizadas para a técnica de FISH, diminuindo-se o custo com extração de DNA.

Ambas as técnicas têm sensibilidade alta, porém a grande limitação na técnica de FISH é que nesta utiliza-se apenas uma sonda para a região 22q11, sendo que na técnica de MLPA, o *kit* usado neste estudo contém 30 sondas para esta região. Além disso, este *kit* possui sondas em outras regiões genômicas nas quais deleções foram descritas anteriormente em pacientes com fenótipo semelhante à S. del 22q11.2.

Estima-se que cerca de 3% dos pacientes apresentam deleções atípicas em 22q11 [46], as quais não foram encontradas neste estudo. Estas não seriam detectadas pela técnica de FISH utilizando apenas a sonda *TUPLE1*. Trabalhos recentes também sugerem que a sonda de FISH comumente utilizada deveria ser a sonda para a região do gene *TBX1* ao invés do gene *TUPLE1*, pois algumas deleções atípicas não incluem o gene *TUPLE1*, mas incluem o *TBX1*. Deste modo, a utilização da sonda para o gene *TBX1* aumentaria a sensibilidade para o diagnóstico por FISH [101].

Quanto à especificidade, ambas as técnicas são altamente específicas. Comparando os resultados obtidos por ambas as técnicas nos pacientes estudados, todos foram concordantes e não houve nenhum resultado falso-positivo. Na técnica de FISH, a especificidade é garantida por esta ser qualitativa e visual. Além disso, o *kit* com a sonda para 22q11 possui uma sonda controle em 22q13. Já a técnica de MLPA possui 30 sondas na região 22q11, sendo que nos casos com deleção típica, observam-se 14 sondas deletadas, o que garante a especificidade do método.

Ambas as técnicas tem nível de complexidade de médio a alto e necessitam de equipamentos específicos. Para MLPA, a análise dos resultados depende de sequenciador automático, que é um equipamento com altos custos de aquisição e manutenção. O treinamento de recurso humano para operação do sistema e interpretação do resultado para elaboração de laudo final, entretanto, é de média complexidade. Além disso, como o método é quantitativo, há necessidade de utilização de controles normais em cada reação, o que inviabiliza a análise individual das amostras. Para diminuir os custos, o ideal é analisar pelo menos 10 amostras ao mesmo tempo, o que pode resultar em atrasos na liberação do resultado. Isso seria minimizado no sistema de laboratório de referência, no qual se supõe o recebimento de um maior número de casos.

Já a técnica de FISH, por ser qualitativa, permite a análise individual dos casos, o que resulta em liberação mais rápida dos resultados. Além disso, apesar de também precisar de equipamentos específicos (microscópio de fluorescência equipado com sistema de captura de imagens), estes têm manutenção mais simples que um sequenciador automático. Com relação a pessoal qualificado, o treinamento de um citogeneticista é de no mínimo um ano, para independência em todas as técnicas necessárias desde a cultura celular, análise por bandamento G, FISH, descrição citogenética e elaboração de laudos.

O tempo mínimo para resultado de ambas as técnicas, considerando todos os procedimentos envolvidos, é de três a quatro dias. Porém, neste trabalho o tempo médio para envio de resultado foi de um mês para cariótipo e FISH e três meses para MLPA. Isso ocorreu, pois neste estudo a análise das amostras seguiu a rotina dos laboratórios onde foi realizado e não havia pessoal exclusivo para a realização destes exames. Além disso, a manutenção de equipamentos também foi responsável por atrasos na liberação de resultados. Em laboratórios particulares que realizam estes exames, o prazo para entrega do resultado é em torno de 15 a 45 dias.

Para MLPA, este tempo foi devido à necessidade de número mínimo de amostras para análise, como exposto anteriormente. A Figura 12 mostrou a variação no número de amostras recebidas em cada mês durante este trabalho, onde se pode observar que o número máximo de amostras recebida em um mês foi oito, em dois meses nenhuma amostra foi recebida e em quatro meses apenas uma amostra foi recebida.

Considerando que foram enviadas amostras de 11 centros diferentes e que a Síndrome de deleção 22q11.2 é a síndrome de microdeleção mais comum, a necessidade de se juntar amostras para análise seria um problema para centros especializados no diagnóstico de apenas uma síndrome de microdeleção. Uma alternativa para a utilização da técnica de MLPA, seria que os centros de diagnóstico oferecessem o diagnóstico das principais síndromes de microdeleção e não apenas de uma delas, pois assim poderia ser utilizado um *kit* de MLPA (*Salsa MLPA kit P064 – Mental Retardation-1 – MRC-Holland*<sup>®</sup>) que contém sondas para as síndromes de microdeleção mais comuns. Deste modo, o número mensal de amostras poderia ser maior e haveria otimização de custos e tempo para entrega de resultados.

O protocolo adaptado para a técnica de FISH, incluindo a diminuição da área de hibridação na lâmina e a diluição da sonda em tampão de hibridação, não levou ao prejuízo na qualidade do sinal fluorescente, garantindo a sensibilidade e especificidade do método. Assim, reduziu-se o custo desta técnica de R\$221,48 para R\$79,00.

Deste modo, no presente trabalho, a técnica de FISH mostrou-se eficaz, mais econômica e mais rápida em comparação a MLPA. Além disso, os casos nos quais foram identificadas aberrações cromossômicas não envolvendo o cromossomo 22 demonstraram a importância de se realizar exame de cariótipo de boa qualidade em casos suspeitos de Síndrome de deleção 22q11.2. Considerando ainda, que para a técnica de FISH a amostra (linfócitos cultivados de sangue periférico) é a mesma utilizada para o exame de cariótipo, a investigação por esta técnica mostrou-se mais vantajosa.

Além das técnicas utilizadas neste trabalho, outras têm sido utilizadas para o diagnóstico de deleção em 22q11. Estas são análise de marcadores polimórficos de DNA por PCR, PCR em tempo real, ambas incluindo *multiplex* PCR, e Hibridação genômica em *arrays* (*aGH*) [68, 71,102, 103]. As técnicas de análise de marcadores polimórficos e de PCR em tempo real têm suas vantagens e desvantagens, sendo uma desvantagem serem métodos indiretos de análise e por isso necessitam de uma acurada padronização antes da aplicação clínica. Estas não têm sido amplamente utilizadas para diagnóstico clínico, mas têm sido mais úteis em pesquisas, para a realização de triagens de grande número de indivíduos com sinais específicos, como cardiopatia e esquizofrenia. Uma vantagem da utilização destas técnicas é o menor custo, quando comparadas à FISH, MLPA e *aGH*.

A técnica de *aGH* tem sido a técnica de preferência para o diagnóstico de deleção em 22q11 nos Estados Unidos [45] e é apontada como primeira opção de diagnóstico genético laboratorial para pacientes com anomalias congênitas múltiplas e (ou) deficiência mental, em países desenvolvidos

[103]. A grande vantagem desta técnica é que além de detectar deleções em 22q11 com alta sensibilidade e especificidade, ela também permite a identificação de qualquer outra alteração genômica nestes pacientes e poderia substituir até mesmo o exame de cariótipo. Porém, esta ainda tem alto custo no Brasil e pouquíssimos laboratórios no país possuem infraestrutura e pessoal treinado para a sua execução e análise, sendo utilizada quase que exclusivamente para pesquisa nos poucos centros onde foi implantada.

Em um trabalho recente que comparou os custos para a realização das técnicas de MLPA e *aGH* no Brasil, apontou-se que mesmo utilizando três diferentes *kits* de MLPA para um mesmo paciente, a técnica de *aGH* é quase cinco vezes mais cara que a técnica de MLPA [75]. Neste trabalho os valores estimados foram de R\$394,00 para MLPA (utilizando três *kits* diferentes) e R\$1.910,00 para *aGH*. Considerando o valor estimado, no presente trabalho, de R\$121,00 para MLPA (utilizando apenas o *kit* específico para Síndrome de deleção 22q11.2), o custo para *aGH* seria 15 vezes maior. Em outras palavras, para cada diagnóstico realizado por *aGH* seria possível realizar 15 diagnósticos por MLPA.

No presente trabalho foram recebidas amostras de 10 diferentes serviços que atendem pacientes com suspeita clínica de Síndrome de deleção 22q11.2, além da instituição sede do projeto. Considerando que para o diagnóstico laboratorial são necessários infraestrutura adequada e pessoal especializado para a realização das análises, seria inviável a implantação do diagnóstico laboratorial em todos os centros, sendo vantajoso o envio de amostras para um único centro. Além disso, há otimização de reagentes específicos, que tem período de validade relativamente curto e amadurecimento da equipe executora quanto à abordagem de problemas e limitações técnicas, tornando o exame de melhor qualidade.

Por outro lado, a pequena quantidade de especialistas e a falta de formação em genética das profissões da saúde podem comprometer a indicação de exames genéticos de modo geral, levando a excesso ou não utilização deste recurso diagnóstico, interpretação dos resultados e orientações das famílias.

As constatações e reflexões efetuadas neste estudo traçam um panorama bastante fidedigno da realização de exames genéticos para diagnóstico da Síndrome de deleção 22q11.2 em serviços públicos e, possivelmente, podem ser generalizadas para outras condições geneticamente determinadas. A realização de outras abordagens de investigação, visando identificar regiões críticas para instalação de centros de referência, logística de envio, possibilidades de diminuição de custos para o diagnóstico, incluindo adaptações técnicas, poderão fornecer outras perspectivas para a implementação racional de métodos diagnósticos em genética no SUS.

*CONCLUSÕES E SUGESTÕES*

---



## 7. Conclusões

- O estudo multicêntrico para diagnóstico da Síndrome de deleção 22q11.2 possibilitou a identificação de dificuldades para este diagnóstico nas 11 instituições participantes e permitiu concluir que o estabelecimento de centros de referência é uma estratégia importante e factível para a realização de exames genéticos no Brasil.

- Disponibilidade temporária do diagnóstico laboratorial de deleção em 22q11, vinculada a projetos de pesquisa ocorreu em sete das 11 instituições participantes deste estudo. Detectaram-se desigualdades regionais, sendo que as três instituições do Nordeste não tinham acesso a exames de cariótipo ou técnicas para investigação da deleção 22q11.

- Microdeleção em 22q11 foi identificada em 35% dos pacientes desta amostra. Foram encontradas aberrações cromossômicas não envolvendo a região 22q11 em três casos. Considerando os resultados de cariótipo e de triagem de microdeleção por MLPA e FISH, obteve-se conclusão diagnóstica em 38% dos casos.

- Foram observadas diferenças significativas para alguns sinais clínicos entre pacientes com e sem deleção em 22q11. Entretanto, como o fenótipo é extremamente variável, estes sinais podem ser considerados para reforçar a suspeita diagnóstica S. Del 22q11.2, mas não podem ser considerados como critérios de inclusão para investigação de deleção em 22q11.

- As técnicas de FISH e MLPA mostraram 100% de sensibilidade e especificidade. Considerando a infraestrutura necessária para implementação e a adaptação da técnica de FISH, esta se mostrou eficaz, mais econômica e mais rápida em comparação a MLPA.

- Em 30 meses foram investigados 100 pacientes provenientes de 11 instituições diferentes. Considerando o número de amostras encaminhadas de cada centro, infraestrutura adequada, pessoal especializado e aquisição de reagentes específicos, o envio de amostras para um único centro foi vantajoso.

## **8. Sugestões**

Os resultados deste estudo propiciaram reflexões que culminaram em sugestões para o incremento desta abordagem para esta e outras condições geneticamente determinadas em nosso país:

1. Identificar regiões e serviços nas diferentes regiões que poderiam formar rede de suporte para exame de cariótipo, criando ou ampliando laboratórios já existentes. Tendo em vista a ausência de dados epidemiológicos brasileiros sobre aberrações cromossômicas, em geral, poderiam ser utilizados os dados de literatura para definição inicial de números de exames por região.
2. Identificar regiões e serviços que poderiam dar suporte para investigação de microdeleções frequentes e estabelecer fluxo entre estes e os laboratórios de citogenética convencional.
3. Estabelecer mecanismo oficial de transporte de amostras para centros de investigação, de acordo com normas de segurança.
4. Estabelecer requisitos mínimos para cadastro dos centros de referência e parâmetros de acreditação e seguimento destes. Preferencialmente, estimular e adequar aqueles que já possuem

infraestrutura e pessoal especializado, visando agilidade e aproveitamento de recursos no processo de implementação dos centros.

5. Investir na fixação de recursos humanos de laboratórios de referência, assim como na formação genética mínima para profissionais da saúde atuantes em nível primário e secundário.
6. Implantar auditoria realizada por médicos geneticistas para pedidos de exames genéticos, visando custo-efetividade.
7. Criar grupo de trabalho para padronização de técnicas e controle de qualidade de exames genéticos, com parceria pública e envolvimento das Sociedades Brasileiras de Genética e Genética Médica.
8. Formar grupos de apoio e discussão para o aconselhamento genético, assegurando o retorno dos resultados e a orientação adequada para os pacientes.
9. Desenhar estudos visando especificamente a análise de custo-efetividade para diferentes técnicas que permitem o diagnóstico de microdeleção, a fim de determinar métodos com melhor custo-efetividade para a realidade nacional.
10. Criar protocolos de avaliação clínica e armazenamento de informações, bases de dados de indicações do exame e resultados a fim de, em longo prazo, traçar perfil epidemiológico das diversas condições geneticamente determinadas no país. Isso também reduziria as desigualdades regionais, quer na identificação, investigação e seguimento clínico.
11. Estabelecer centros de pesquisa que poderiam sediar investigação laboratorial complementar em casos especiais.

12. Estabelecer uma rede nacional de suporte laboratorial virtual, para contato entre médicos e centros de investigação, para esclarecimento de dúvidas e discussão de estudos complementares para diagnóstico.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---



## 9. Referências Bibliográficas

- 1 - Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Informações e Análises Epidemiológicas. Painel de Monitoramento da Mortalidade Infantil e Fetal [Acesso em 3 de Nov de 2011]. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/infantil.show.mtw>; 2011a.
- 2 - Brasil. Portaria MS GM/MS nº. 22 de 15 de janeiro de 1992. Trata do Programa de Diagnóstico Precoce do Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria. Diário oficial da União, 15 de janeiro de 1992. Brasília, 1992.
- 3 - Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM/ MS 822 de 06 de junho de 2001: Institui o Programa de Triagem Neonatal no âmbito do Sistema único de Saúde. Diário Oficial da União, de 06 de junho de 2001. Brasília; 2001.
- 4 - Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS [Acesso em 03 de Nov de 2011]. Disponível em: <http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/procedimento/exibir/0202100030/12/2011>; 2011b.
- 5 - Brasil. Portaria SAS/MS n.126, 21 de setembro de 1993. Cria grupos e procedimentos para tratamento de lesões labiopalatais na tabela SIH/SUS, e dá outras providências. Diário Oficial da União, n. 180. Brasília, DF 1993.
- 6 - Brasil. Portaria SAS/MS nº 62. Normaliza cadastramento de hospitais que realizem procedimentos integrados para reabilitação estético-funcional dos portadores de má-formação labiopalatal para o Sistema Único de Saúde, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 14 de abril de 1994. Brasília; 1994.
- 7 - Brasil. Reduzindo as desigualdades e ampliando o acesso à assistência à saúde no Brasil 1998-2002. Brasília-DF: Ministério da Saúde; 2002.
- 8 - Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. Am J Med Genet. 1998;75(2):126-37.
- 9 - Ruitter EM, Bongers EM, Smeets DF, Kuijpers-Jagtman AM, Hamel BC. No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. Clin Genet 2003;64(3):216-9.
- 10 - World Health Organization. Global strategies to reduce the health –care burden of craniofacial anomalies. Report of WHO meetings on International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies. Geneva: WHO; 2002.
- 11 - Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2380, de 28 de outubro de 2004. Institui grupo de Trabalho de Genética Clínica, e dá outras providências. Diário Oficial da União, de 28 de outubro de 2004. Brasília; 2004.
- 12 - Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 81 de 20 de Janeiro de 2009. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica. Diário Oficial da União, seção 1, nº 14, 21 de janeiro de 2009. Brasília; 2009.

- 13 - Horovitz DD, Cardoso MH, Llerena JC Jr, de Mattos RA. Birth defects in Brazil and health care: proposals for public policies in clinical genetics. *Cad Saude Publica* 2006;22(12):2599-609.
- 14 - Monlleo IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Brazil's Craniofacial Project: Genetic Evaluation and Counseling in the Reference Network for Craniofacial Treatment. *Cleft Palate–Craniofac J* 2006a;43(5):577-9.
- 15 - Ramalho AS, Magna LA, de Paiva-e-Silva RB. [Government Directive MS # 822/01: unique aspects of hemoglobinopathies for public health in Brazil]. *Cad Saude Publica* 2003;19(4):1195-9.
- 16 - Paim J, Travassos C, Almeida C, Bahia L, Macinko J. The Brazilian health system: history, advances, and challenges. *Lancet* 2011;377(9779):1778-97.
- 17 - Victora CG, Aquino EM, do Carmo Leal M, Monteiro CA, Barros FC, Szwarcwald CL. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. *Lancet* 2011;377(9780):1863-76.
- 18 - Brasil. Constituição Federal. Seção II – Da Saúde. Art. 196. Brasília, DF 1988.
- 19 - Travassos C, de Oliveira EXG, Viacava F. Desigualdades geográficas e sociais no acesso aos serviços de saúde no Brasil: 1998 e 2003. *Cien Saude Colet* 2006;11(4):975-86.
- 20 - Novoa MC, Burnham TF. Desafios para a universalização da genética clínica: o caso brasileiro. *Rev Panam Salud Publica* 2011;29(1):61-8.
- 21 - Beiguelman B. Human and Medical Genetics in Brazil. *Genet Mol Biol* 2000;23(2):277-81.
- 22 - Pubmed [Acesso em 02 de Novembro de 2011]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 23 - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – censo 2010. [Acesso em 02 de Novembro de 2011]. Disponível em <http://dgp.cnpq.br/censos/>; 2011.
- 24 - Marques-de-Faria AP, Ferraz VEF, Acosta AX, Brunoni D. Clinical Genetics in Developing Countries: The case of Brazil. *Community Genet* 2004;7:95-105.
- 25 - Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics* 2009;12:53-58.
- 26 - CFM/AMB/CNRM. 2011. Pesquisa: Demografia Médica no Brasil, 2011. <http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=NoticiasC&id=2323> (accessed on 01/04/2012).
- 27 - Monlleó IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Anomalias Craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. *Cadernos de Saúde Pública* 2006b;22(5):913-922.
- 28 - ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas) Documento Final. Angra dos Reis: XXXVI ECLAMC; 2004. (Versão eletrônica: Fevereiro 2005, Rio de Janeiro).
- 29 - Strauss RP. The American Cleft Palate-Craniofacial Association (ACPA) Team Standards Committee. Cleft Palate and Craniofacial Teams in the United States and Canada: A National Survey of Team Organization and Standards of Care. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 1998; 35:473-80.
- 30 - Hammond M, Stassen L. Do you CARE? A national register for cleft lip and palate patients. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 1999;37:81-6.

- 31 - Shaw WC, Semb G, Nelson P, Brattström V, Molsted K, Prah-Andersen B, Gundlach KKH. The Eurocleft Project 1996-2000: overview. *Journal of Cranio-maxillofacial Surgery* 2001;29:131-40.
- 32 - Craniofacial Anomalies Network (CRANE). Report on the register: February 2003. <http://www.cfs.gb.org.uk/care/>
- 33 - Brasil. Portaria GM/MS n. 1278, de 20 de outubro de 1999. Normaliza cadastramento de centros/núcleos para realização de implante coclear e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, n. 202. Brasília, DF, 1999.
- 34 - Moreno YF, Nogueira RJ, Gil-da-Silva-Lopes VL. Estado nutricional de crianças com fenda labiopalatal e palatal em seguimento clínico em hospital não especializado. *Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Genética Clínica*, 2006; Guarujá, Brasil.
- 35 - Amstalden-Mendes LG, Magna LA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Neonatal care of infants with cleft lip and/or palate: feeding orientation and evolution of weight gain in a nonspecialized Brazilian hospital. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007;44(3):329-34.
- 36 - Monlleo IL, Mossey PA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Evaluation of craniofacial care outside the Brazilian reference network for craniofacial treatment. *Cleft Palate Craniofac J* 2009;46(2):204-11.
- 37 - Saal HM. Classification and description of nonsyndromic clefts. In: Wyszynski DF. *Cleft lip and palate: From origin to treatment*. New York: Oxford University Press, 2002.
- 38 - Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plastic Surg* 2004;31:125-140.
- 39 - Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:270-278.
- 40 - Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 2000;97(2):128-35.
- 41 - Fernández L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares A, Martinez I, Fernández B, Quero J, Guereta LG, Alix AG, Burgueros M, Gomez EG, Pérez JMC, Granero AP, Juan LT, Suner DH, Rosell J, Delicado A. Unrelated Chromosomal Anomalies Found in Patients With Suspected 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1134-41.
- 42 - Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge and Velocardiofacial Syndromes). *Curr Opin Pediatr* 2002;14:578-83.
- 43 - Kobrynski L, Sullivan K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet* 2007;370:1443-52.
- 44 - Shprintzen, RJ. Velo-Cardio-Facial Syndrome: 30 Years of Study. *Developmental Disabilities* 2008;14:3-10.
- 45 - McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)* 2011;90(1):1-18.
- 46 - Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14(1):11-8.

- 47 - Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC, et al. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1992;44(2):261-8.
- 48 - Tobias ES, Morrison N, Whiteford ML, Tolmie JL. Towards earlier diagnosis of 22q11 deletions. *Arch Dis Child* 1999;81(6):513-4.
- 49 - Bartsch O, Nemecková M, Kocárek E, Wagner A, Puchmajerová A, Poppe M, Ounap K, Goetz P. DiGeorge/velocardiofacial syndrome: FISH studies of chromosomes 22q11 and 10p14, and clinical reports on the proximal 22q11 deletion. *Am J Med Genet A* 2003;117A(1):1-5.
- 50 - Katzman PJ, Wang B, Sawhney M, Wang N. Differential detection of deletion 22q11.2 syndrome by specialty and indication. *Pediatr Dev Pathol* 2005;8(5):557-67.
- 51 - Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballin MR, Guitart M. Microdeletion and Microduplication 22q11.2 Screening in 295 patients With Clinical Features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome. *Am J Med Genet A* 2006;140A:2426-32.
- 52 - Oh AK, Workman LA, Wong GB. Clinical correlation of chromosome 22q11.2 fluorescent in situ hybridization analysis and velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate Craniofac J* 2007;44(1):62-6.
- 53 - Belangero SI, Bellucco FT, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MC, Melaragno MI. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. *Arq Bras Cardiol* 2009;92(4):307-11.
- 54 - Rope AF, Cragun DL, Saal HM, Hopkin RJ. DiGeorge anomaly in the absence of chromosome 22q11.2 deletion. *J Pediatr* 2009;155(4):560-5.
- 55 - Smith A, St Heaps L, Robson L. Apparently unrelated cytogenetic abnormalities among 462 probands referred for the detection of del(22q) by FISH. *Am J Med Genet* 2002;113(4):346-50.
- 56 - Sgardioli IC. *Investigação Laboratorial da Síndrome Velocardiofacial e Possíveis Fenocópias [Dissertação]*. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2011.
- 57 - Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* 1988;43(5):605-11.
- 58 - Tsai CH, Van Dyke DL, Feldman GL. Child with velocardiofacial syndrome and del (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet* 1999;82(4):336-9.
- 59 - Lindstrand A, Malmgren H, Verri A, Benetti E, Eriksson M, Nordgren A, Anderlid BM, Golovleva I, Schoumans J, Blennow E. Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am J Med Genet A* 2010;152A(5):1233-43.
- 60 - Prescott K, Woodfine K, Stubbs P, Super M, Kerr B, Palmer R, Carter NP, Scambler P. A novel 5q11.2 deletion detected by microarray comparative genomic hybridisation in a child referred as a case of suspected 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet* 2005;116(1-2):83-90.
- 61 - Tokuyasu TA, Cotter PD, Segraves R, Harris J, Elder ME, Gonzales M, Pinkel D, Albertson DG, Rauen KA. Detection of single clone deletions using array CGH: identification of submicroscopic deletions in the 22q11.2 deletion syndrome as a model system. *Am J Med Genet A* 2007;143A(9):925-32

- 62 - Brunet A, Armengol L, Heine D, Rosell J, García-Aragonés M, Gabau E, Estivill X, Guitart M. BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *BMC Med Genet* 2009;10:144.
- 63 - Yagi H, Yoshiyuki F, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Hoo K, Kimura M, Imamura SI, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. *The Lancet* 2003;362:1366-73.
- 64 - Zweier C, Sticht H, Yaylagül I A, Campbell CE, Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet* 2007;80(3):51
- 65 - Reish O, Finkelstein Y, Mesterman R, Nachmani A, Wolach B, Fejgin M, Amiel A. Is isolated palatal anomaly an indication to screen for 22q11 region deletion? *Cleft Palate Craniofac J* 2003;40(2):176-9.
- 66 - Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH. The association of the DiGeorge anomalad with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 1982;101:197-200.
- 67 - Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, Marino B, Oskarsdottir S, Philip N, Sullivan K, Swillen A, Vorstman J; International 22q11.2 Deletion Syndrome Consortium. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr* 2011;159(2):332-9.
- 68 - Pereira AC, Corrêa RF, Mota GF, Kim CA, Mesquita SF, Krieger JE. High specificity PCR screening for 22q11.2 microdeletion in three different ethnic groups. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(10):1359-65.
- 69 - Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Lopes AA, Krieger JE. PCR screening for 22q11.2 microdeletion: development of a new cost-effective diagnostic tool. *Clin Chim Acta* 2006;369(1):78-81.
- 70 - Sandrin-Garcia P, Abramides DV, Martelli LR, Ramos ES, Richieri-Costa A, Passos GA. Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem* 2007;303(1-2):9-17.
- 71 - Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 2005;6:180.
- 72 - Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.
- 73 - Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet* 2005;68(4):373-8.
- 74 - Rosa RF, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, Koshiyama DB, Hertz MT, Ricachinevsky CP, Roman T, Varella-Garcia M, Paskulin GA. 22q11.2 deletion syndrome in

patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *Am J Med Genet A* 2008;146A(13):1655-61.

75 - Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, Kim CA, Passos-Bueno MR. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet* 2011;54(4):e425-32.

76 - Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-6.

77 - Sanchez O, Escobar JJ, Yunis JJ. A simple G-banding technique. *Lancet* 1973;2(7823):269.

78 - Lincoln-de-Carvalho CR. Técnica de MLPA: uma alternativa para a investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.

79 - Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra G, Farah SB, Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1-13.

80 - Carvalho GI, Santos L. Sistema Único de Saúde. Comentários à Lei Orgânica da Saúde (Leis n. 8.080/90 e n. 8.142/90). 3ª edição. Campinas: Editora da Unicamp; 2002. 331p.

81 - Cecílio LCO. As necessidades de saúde como conceito estruturante na luta pela integralidade e equidade na atenção em saúde. In: Pinheiro R, Mattos RA, org. Os sentidos da integralidade na atenção e no cuidado à saúde. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro: UERJ, IMS: ABRASCO; 2001. p.113-26.

82 - Bueno, BH, Monlleó IL, Gil-da-Silva-Lopes, VL: Estudo transversal sobre conhecimentos de genética médica aplicados à atenção básica no SUS. 2011 (dados ainda não publicados).

83 - Monlleó IL. Anomalias craniofaciais, genética e saúde pública: contribuições para o reconhecimento da situação atual da assistência no Sistema Único de Saúde [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

84 - Amstalden-Mendes LG. Assistência fonoaudiológica aos indivíduos com fenda de lábio e(ou) palato: aspectos de saúde sob a Visão da Família [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

85 - Monlleó IL. Atenção a pessoas com Anomalias Craniofaciais no Brasil: avaliação e propostas para o sistema único de saúde [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008.

86 - Amstalden-Mendes LG. Aspectos da atenção à saúde a indivíduos com fenda de lábio e(ou) palato no Brasil e propostas para seu incremento no SUS [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2011.

87 - Nogueira RJN. Fatores preponderantes para a nutrição de indivíduos com fenda orofacial típica e propostas para seu manejo [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2011.

- 88 - Porciúncula CGG, Marques-de-Faria AP, Norato DYJ: O ensino de Genética nos cursos de Medicina do país. Livro de Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Genética Clínica, 2002, p 61.
- 89 - Barch MJ, Kutsen T, Spurbeck JL. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>a</sup> ed. Lippincott Raven. 1997.
- 90 - Fontes MB, Almeida LN, Reis-Junior GO, Vieira-Filho IJ, Santos KM, Anjos FS et al. Local strategies to address health needs of individuals with Oral clefts in Alagoas, Brazil. The Cleft Palate-Craniofacial Journal, *in press*.
- 91 - Sgardioli IC, Vieira TP, Viguetti-Campos NL, Prota J, Monteiro FP, Gil-da-Silva-Lopes VL. Familial segregation of an interchromosomal insertion (9;15)(q33;q21.1-q22.21) with three individuals carrying an unbalanced karyotype characterized by high resolution array. In: European Journal of Human Genetics, 2011, Amsterdam.
- 92 - Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R, Gewillig M, Eyskens B, Hjalgrim H, Dolmer B, McGaughran J, Brøndum-Nielsen K, Marynen P, Fryns JP, Vermeesch JR. Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. Am J Hum Genet 1999;64(4):1119-26.
- 93 - Vieira TP, Simione M, Sgardioli IC, Maurer-Morelli C, Cendes IL, Fett-Conte AC, Gil-da-Silva-Lopes VL. 8p23.1 duplication and 15q25-26 duplication due to an (11;15)(p13;q25q26) insertion characterized by high resolution array in a patient with aniridia. In: 60th meeting of the American Society of Human Genetics, 2010, Washington.
- 94 - Blennow E, Lagerstedt K, Malmgren H, Sahlén S, Schoumans J, Anderlid B. Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. Clin Genet 2008;74(1):61-7.
- 95 - McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. Dev Disabil Res Rev. 2008;14(1):69-74.
- 96 - Costain G, Chow EW, Silversides CK, Bassett AS. Sex differences in reproductive fitness contribute to preferential maternal transmission of 22q11.2 deletions. J Med Genet 2011;48(12):819-24.
- 97 - Sivertsen A, Lie RT, Wilcox AJ, Abyholm F, Vindenes H, Haukanes BI, Houge G. Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. Am J Med Genet A 2007;143(2):129-34.
- 98 - Bashir MA, Hodgkinson PD, Montgomery T, Splitt M. 22q11 Deletion in children with cleft lip and palate--is routine screening justified? J Plast Reconstr Aesthet Surg 2008;61(2):130-2.
- 99 - Flynn T, Möller C, Jönsson R, Lohmander A. The high prevalence of otitis media with effusion in children with cleft lip and palate as compared to children without clefts. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2009;73(10):1441-1446.
- 100 - Sørensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, Schouten JP, Christiansen M. Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. J Mol Diagn 2010;12(2):147-51.
- 101 - Beaujard MP, Chantot S, Dubois M, Keren B, Carpentier W, Mabboux P, Whalen S, Vodovar M, Siffroi JP, Portnoï MF. Atypical deletion of 22q11.2: detection using the FISH TBX1 probe and molecular characterization with high-density SNP arrays. Eur J Med Genet 2009;52(5):321-7.

102 - Yang C, Zhu X, Yi L, Shi Z, Wang H, Hu Y, Wang Y. Comparative study of three PCR-based copy number variant approaches, CFMSA, M-PCR, and MLPA, in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009;13(6):803-8.

103 - Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010;86(5):749-64.

*ANEXOS E APÊNDICES*

---



## Anexo 1



### Estudo multicêntrico para validação de base de dados e de estratégia para investigação diagnóstica de fendas orofaciais no Brasil

#### Síndrome Velocardiofacial

Coordenadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Departamento de Genética Médica / FCM / UNICAMP



Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número de registro: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F

Hospital Participante: \_\_\_\_\_

Médico Responsável Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

#### Critérios de inclusão

Indivíduos com suspeita clínica de Síndrome de deleção 22q11 com:

Fenda palatal  
Fenda labial com ou sem fenda palatal

Fenda palatal submucosa ou insuficiência velo-faríngea **confirmados por Nasofibroscopia**

#### Ecocardiografia

**Outros exames desejáveis:** ressonância magnética ou tomografia computadorizada de crânio; ultra-som abdominal e de vias urinárias; avaliação oftalmológica e avaliação auditiva.

Dados antropométricos								
Peso:	Kg	pt	Estatura:	Cm	pt	PC:	cm	Pt
DICE:	cm		DICI:	cm		Dedo médio/Mão	%	Pt

Sinais clínicos
<b>1 – Cardiopatia congênita</b>
<p>Realizou ecocardiografia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Aguarda resultado</p> <p>( ) Normal</p> <p>( ) Anomalias Conotruncais (Tetralogia de Fallot, interrupção de arco aórtico)</p> <p>( ) Defeito de septo interventricular</p> <p>( ) <i>Truncus arteriosus</i></p> <p>( ) Anel vascular</p> <p>( ) Outras: _____</p>
<b>2 – Anomalias palatais</b>
<p>Realizou nasofibroscopia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Aguarda resultado</p> <p>( ) Normal</p> <p>( ) Insuficiência velo-faríngea</p> <p>( ) Fenda palatal ou ( ) fenda palatal submucosa</p> <p>( ) Fenda labial com ou sem fenda palatal: ( ) FL, ( ) FLP</p> <p>( ) Úvula bífida</p> <p>( ) Voz anasalada</p> <p>( ) Disfagia</p> <p>( ) Outras: _____</p>

<b>3 – Fácies característica</b>
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Orelhas baixas/dismórficas <input type="checkbox"/> Face alongada <input type="checkbox"/> Hipertelorismo <input type="checkbox"/> Queda palpebral <input type="checkbox"/> Nariz típico (raiz proeminente, hipoplasia alar, ponta bulbosa/bífida) <input type="checkbox"/> Microcefalia <input type="checkbox"/> Outras: _____
<b>4 – Alterações imunológicas</b>
<input type="checkbox"/> Sem sinais e sintomas <input type="checkbox"/> Não avaliado <input type="checkbox"/> Imunodeficiência: <input type="checkbox"/> diminuição de linfócitos T, <input type="checkbox"/> deficiência de IgA, <input type="checkbox"/> deficiência humoral, <input type="checkbox"/> infecções de repetição <input type="checkbox"/> Doenças auto-imunes: <input type="checkbox"/> Artrite reumatóide juvenil, <input type="checkbox"/> PTI (Púrpura trombocitopênica idiopática), <input type="checkbox"/> hipo/hipertireoidismo <input type="checkbox"/> Hipocalcemia secundária a hipoparatiroidismo
<b>5 – Desenvolvimento neuro-cognitivo e comportamental</b>
<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> RDNPM <input type="checkbox"/> Atraso/ distúrbio de linguagem

Dificuldade de aprendizagem

Distúrbio comportamental/psiquiátrico:  TDAH (Transtorno de déficit de atenção/Hiperatividade),  traços autísticos,  esquizofrenia,  impulsividade,  perseveração

**6 – Desenvolvimento somático**

Normal

Dificuldade alimentar

Baixa estatura

Alterado – descrever: \_\_\_\_\_

**7 – Hipoacusia**

Sem sinais e sintomas

Não avaliado

Avaliado:

normal

Neurosensorial

Condutiva

Outros: \_\_\_\_\_

**8 – Alterações oftalmológicas**

Sem sinais e sintomas

Não avaliado

Avaliado:

normal

*Embriotoxon posterior*

- Tortuosidade de vasos retinianos
- Estrabismo
- Outros – coloboma, hipoplasia de nervo óptico, catarata, alterações de íris

#### **9 – Alterações neurológicas**

- Não avaliado
- Avaliado por tomografia computadorizada  
Descrever: \_\_\_\_\_
- Avaliado por ressonância magnética:
  - Atrofia cerebral
  - Anomalias de corpo caloso
  - Hipoplasia cerebelar
  - Alterações de substância branca
  - Polimicrogiria
  - Outros – descrever: \_\_\_\_\_

#### **10 – Alterações de trato urinário**

- Sem sinais e sintomas
- Não avaliado
- Avaliado por ultrassonografia
- Alterações anatômicas:  rins em ferradura,  duplicação renal,  agenesia renal,  duplicação sistema coletor
- Nefrocalcinose
- RVU (Refluxo vesico-ureteral)
- Outros – descrever: \_\_\_\_\_

**11 – Alterações de trato gastrointestinal**

- ( ) Sem sinais e sintomas
- ( ) Não avaliado
- ( ) Avaliado por ultrassonografia
- ( ) Constipação
- ( ) Malrotação intestinal
- ( ) RGE (Refluxo gastroesofágico)
- ( ) Outros: ( ) ânus imperfurado, ( ) atresia esofágica, ( ) Hirschsprung – descrever:

\_\_\_\_\_

**12 – Alterações esqueléticas**

- ( ) Sem sinais e sintomas
- ( ) Avaliação clínica
- ( ) Avaliação radiológica
- ( ) Escoliose
- ( ) Pés tortos
- ( ) Polidactilia
- ( ) Alterações costo-vertebrais
- ( ) Outros: \_\_\_\_\_

<b>Descrever resultados dos exames realizados:</b>
Cariótipo:
FISH:

<b>Heredograma:</b>
---------------------

## Anexo 2



CEP, 24/06/08.  
(PARECER CEP: N° 059/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

### PARECER

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "PROPOSTA PARA A INSERÇÃO DA GENÉTICA CLÍNICA NA ATEÇÃO DE PORTADORES DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vera Lucia Gil da Silva Lopes

#### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que acrescenta o projeto intitulado "ESTUDO MULTICÊNTRICO PARA VALIDAÇÃO DE BASE DE DADOS E DE ESTRATÉGI PARA INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA DE FENDAS OROFACIAIS NO BRASIL", referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.

  
**Profa. Dr. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



## Anexo 3



# Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## *Diagnóstico laboratorial – Síndrome Velocardiofacial*

Projeto: **Estudo Multicêntrico para Validação de Base de Dados e de Estratégia para Investigação Diagnóstica de Fendas Orofaciais no Brasil.**

Coordenadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Responsável local/ Hospital participante: \_\_\_\_\_

### **Qual o objetivo desse estudo?**

Este estudo tem como objetivo identificar anormalidades nos cromossomos de indivíduos com anomalias palatais e suspeita de Síndrome Velocardiofacial.

### **Como esse estudo será feito?**

Todos os pacientes são primeiramente avaliados por um médico geneticista que realiza avaliação clínica, registro fotográfico e história familiar. Além da avaliação médica serão realizados exames complementares, que poderão ser todos ou alguns dos seguintes, dependendo da necessidade: nasofibroscopia, ecocardiografia, ressonância magnética ou tomografia computadorizada, ultra-som abdominal e de vias urinárias, avaliação oftalmológica e auditiva. Após a avaliação médica será realizada coleta de sangue por punção venosa. O sangue do paciente será utilizado para extração do DNA ou para cultivo celular, a partir dos quais serão investigadas perdas ou ganhos de pequenos fragmentos dos cromossomos.

Se houver algum achado no exame que necessite mais investigação, poderá ser necessária nova coleta, para confirmação dos resultados. Todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e guardadas nos Laboratórios de Genética Molecular e Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP.

Para todos os pacientes está previsto o armazenamento de DNA para estudos futuros, no entanto, o responsável pelo paciente poderá escolher entre autorizar ou não o armazenamento do DNA. De todo modo, antes de se realizar qualquer estudo futuro, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para tal.

#### **Existe risco ou desconforto?**

Para as avaliações pelo médico geneticista, não haverá riscos ou desconfortos para os pacientes e suas famílias.

Os exames complementares serão realizados por profissionais habilitados, sendo que para a realização da Ressonância Magnética, as crianças menores de cinco anos e aquelas de difícil controle necessitarão receber um calmante. Normalmente, isso já é realizado. A anestesia pode, em alguns casos, fazer o coração bater mais rápido, dificuldade para respirar, aumento de saliva na boca e agitação. Todos esses são sintomas temporários.

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e com material adequado, com risco apenas de dor leve durante a coleta e a possibilidade de formação de manchas rochas no local onde for realizada a coleta.

#### **Quais as vantagens em participar deste estudo?**

A avaliação do médico geneticista, juntamente com a realização dos exames complementares, pode contribuir para identificação de outras alterações associadas à anomalia palatal, possibilitando orientações quanto a condutas antecipatórias mais específicas.

Os exames realizados no DNA e nos cromossomos podem mostrar se existe ou não alterações pequenas em um dos cromossomos do paciente, podendo ajudar o geneticista a realizar uma orientação

mais específica sobre risco de acontecer novamente na família. Por outro lado, os conhecimentos obtidos com esta pesquisa poderão ajudar a entender as causas desses defeitos congênitos.

Não haverá qualquer forma de pagamento ou remuneração aos indivíduos que participarem deste estudo.

### **A participação é obrigatória?**

**NÃO!** Só participarão os interessados. Mesmo assim, se durante o estudo não houver mais interesse, a participação poderá ser interrompida. Se a participação nesse estudo for interrompida, os cuidados médicos rotineiros **não** serão interrompidos ou modificados, atualmente ou no futuro.

### **Quem terá acesso aos resultados?**

Todos os resultados dos exames serão transmitidos ao responsável pelo paciente pelo médico geneticista em consulta médica previamente agendada. Se os resultados e informações forem utilizados para fins de publicação em congressos ou revistas científicas, nenhuma identificação do paciente será utilizada.

### **Com quem posso esclarecer minhas dúvidas?**

As dúvidas poderão ser esclarecidas, em qualquer fase do estudo, com o médico assistente que o convidou para o estudo, com o biomédico Társis P. Vieira ou com a Dra. Vera Lopes Gil da Silva Lopes. O esclarecimento deverá ser feito durante as consultas ou pelo telefone da UNICAMP (19) 35218908.

A secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, também poderá ser contatada, em caso de informação ou reclamações, pelo telefone (19) 35217232.

## AUTORIZAÇÃO

Sua autorização significa que você permite a inclusão do paciente pelo qual é responsável no estudo. Portanto, autoriza a utilização dos dados para a pesquisa. Fica claro, também, que os resultados dos exames deste paciente serão entregues aos responsáveis pelo médico geneticista responsável pelo atendimento.

Assinando este documento, confirmo que o (a) Dr. (a): \_\_\_\_\_ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos, os riscos, desconforto e possíveis vantagens em participar desse estudo. Eu li, foi explicado e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_ R.G.: \_\_\_\_\_

Endereço e telefone para contato: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante ou responsável

\_\_\_\_\_

Data

## RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens em participar desse estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_

Data

### **AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

Eu concordo que o DNA de minha família seja estocado

Eu não concordo que o DNA de minha família seja estocado

Assinatura: \_\_\_\_\_



## Apêndice 1



**Questionário sobre disponibilidade de diagnóstico laboratorial de Síndrome Velocardiofacial (SVCF)**

Instituição: \_\_\_\_\_

Médico geneticista: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### A. Aspectos referentes ao diagnóstico clínico de SVCF:

**1. Avaliação/ exames complementares disponíveis ou acessíveis à instituição onde os pacientes são atendidos:**

- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | Ecocardiografia                              |
| <input type="checkbox"/> | Nasofibrolaringoscopia                       |
| <input type="checkbox"/> | Avaliação oftalmológica                      |
| <input type="checkbox"/> | Avaliação otorrinolaringológica              |
| <input type="checkbox"/> | Tomografia computadorizada de crânio         |
| <input type="checkbox"/> | Ressonância magnética de crânio              |
| <input type="checkbox"/> | Ultrassonografia de abdômen e vias urinárias |
| <input type="checkbox"/> | Radiografia                                  |
| <input type="checkbox"/> | Outros. Descrever: _____                     |

## **B. Envio de amostras para diagnóstico laboratorial na Unicamp:**

### **1. Houve casos que não puderam ser encaminhados?**

- Não  
 Sim

Se sim, número de casos: \_\_\_\_\_

Motivo:

- Falta de exames complementares que permitem a suspeita clínica de SVCF;  
 Não comparecimento do paciente à consulta agendada;  
 Falta de interesse da família na investigação diagnóstica;  
 Dificuldade de reconvocação de pacientes do serviço;  
 Outro. Descrever: \_\_\_\_\_

### **2. Houve dificuldades no envio de amostras?**

- Não  
 Sim

Se sim, qual: \_\_\_\_\_

### **3. Qual a forma de envio escolhida?**

- Sedex  
 Varig Log

**C. Aspectos relacionados à disponibilidade local ou regional de exames laboratoriais:**

**1. Exames disponíveis:**

**Cariótipo**

Própria Instituição     Outra instituição\*:

Mesma cidade     Sim     Não

Mesmo estado     Sim     Não

Público     Privado

**Investigação de microdeleção:**

Método:     FISH     MLPA

PCR em tempo real

Análise de polimorfismos de DNA microsatélite

Própria Instituição     Outra instituição\*:

Mesma cidade     Sim     Não

Mesmo estado     Sim     Não

Público     Privado

\*Exceto Unicamp.

**2. Investigação de deleção em 22q11:**

2.1. Já teve esta investigação específica na instituição ou em outro local acessível à instituição?

Sim     Mesma instituição     Outra instituição

Não

2.2 Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_

2.3 Qual a fonte de recursos? \_\_\_\_\_

2.4 Por que foi interrompida? \_\_\_\_\_

### 3. Infraestrutura local:

3.1. Existem equipamentos em funcionamento na instituição para a realização das seguintes técnicas?

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | Cariótipo   |
| <input type="checkbox"/> | FISH  |
| <input type="checkbox"/> | MLPA ou análise de DNA microssatélite (Sequenciador automático) |
| <input type="checkbox"/> | PCR em tempo real   |

3.2. Existem profissionais treinados para a realização e interpretação destas técnicas?

- |                          |            |          |  |                          |            |                          |            |
|--------------------------|------------|----------|--|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
| <input type="checkbox"/> | Não        |          |  |                          |            |                          |            |
| <input type="checkbox"/> | Sim        | Vínculo: | <table border="1"><tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Permanente</td></tr><tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Temporário</td></tr></table> | <input type="checkbox"/> | Permanente | <input type="checkbox"/> | Temporário |
| <input type="checkbox"/> | Permanente |          |  |                          |            |                          |            |
| <input type="checkbox"/> | Temporário |          |  |                          |            |                          |            |

Quais técnicas? Descrever: \_\_\_\_\_