

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ROMINA SOLEDAD HEREDIA GARCIA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE EXAMES  
GENÉTICOS COMPLEMENTARES PREVISTOS NA  
PORTARIA NÚMERO 199/14 NO DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS GENÉTICAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
BRASÍLIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

**BRASÍLIA**

**2018**

**ROMINA SOLEDAD HEREDIA GARCIA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE EXAMES GENÉTICOS  
COMPLEMENTARES PREVISTOS NA PORTARIA NÚMERO 199/14  
NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS GENÉTICAS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA**

Banca Examinadora

Presidente: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Universidade de Brasília

Membro: Natan Monsores de Sá

Universidade de Brasília

Membro: Luiz Cláudio Gonçalves de Castro

Universidade de Brasília

Suplente: Patrícia Natália Silva Moretti

Universidade de Brasília

*Aos meus filhos, Elias e Isabella.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar à minha orientadora Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, referência profissional e de pessoa, por todo o apoio e a paciência.

À toda equipe do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília e da Universidade de Brasília por toda a ajuda na realização deste trabalho, especialmente à Dra. Íris Ferrari, Dra. Mara Córdoba, Dra. Beatriz Versiani e Dra. Rosenelle Oliveira Araujo Benício.

À Dra. Teresinha de Oliveira Cardoso pelo exemplo profissional, de garra e determinação.

Aos colegas da Unidade de Genética do Hospital de Apoio, pela assistência no dia a dia.

Ao Prof. Dr. Robert Pogue, que gentilmente me orientou durante meu estágio na Universidade Católica de Brasília.

Aos meus professores na Argentina, que foram os que me introduziram ao mundo da Biologia e da Genética, especialmente Sara Ortubia, Guillermo Montero, Daniel Loyola e Silvia Sendra e à Dra. Jorgelina Karantzias, exemplo de médica e de pessoa.

Aos meus pais, Stella e Beto a Cassiomar, por toda a ajuda e suporte em todos estes anos de estudo.

À minha amiga Graziela, pelo suporte incondicional em todas as matérias da vida.

Por último, queria agradecer às famílias e aos pacientes sem os quais este trabalho não teria sido possível.

## RESUMO

Cada ano nascem, no mundo, 7,6 milhões de crianças com algum defeito congênito ou doença genética. Estima-se que no Brasil, sejam 13 milhões de pessoas afetadas. No início dos anos 2000, movimentos sociais e a pressão de pacientes e familiares levaram a que a questão das doenças raras entrasse na agenda da saúde pública e, em 2014, foi publicada pelo Ministério da Saúde do Brasil, a Portaria GM/MS nº 199, que institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. Nela ficam estabelecidos os princípios e diretrizes para o atendimento integral a estas pessoas no âmbito do Sistema Único de Saúde, incluindo os exames disponibilizados. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a contribuição das diferentes metodologias de diagnóstico clínico, citogenético e molecular na elucidação diagnóstica em pacientes atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília, visando avaliar a melhora no diagnóstico com a implantação dessa Portaria. Para isso, foram analisados os prontuários de 299 pacientes, quanto à sexo, idade, motivo do encaminhamento, exames genéticos complementares e se foi possível realizar o diagnóstico baseado nessas metodologias ou pelo quadro clínico. O diagnóstico clínico foi possível em 17,7% dos pacientes. O cariótipo contribuiu para o diagnóstico em 14%, a análise cromossômica por microarranjos (CMA) em 6,35%, a pesquisa de mutações em *FMR1* para pesquisa da Síndrome do X-frágil em 0,66% e a amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação multiplex (MLPA) em 0,33%. Sessenta por cento dos pacientes ficaram sem diagnóstico. O rendimento diagnóstico dos exames foi concordante com os previstos pela literatura. Os exames previstos na Portaria GM/MS nº 199/2014 aumentaram a possibilidade diagnóstica, porém, a demora na publicação da Portaria, fez com que não fossem contemplados exames genéticos mais atuais, que aumentariam ainda mais a chance de diagnóstico, principalmente para as doenças gênicas.

**Palavras-chave:** doenças raras, Portaria GM/MS nº199/14, cariótipo, CMA, *FMR1*, MLPA.

## ABSTRACT

Every year, 7.6 million children worldwide are born with a birth defect or genetic disease. It is estimated that in Brazil, 13 million people are affected. In the early 2000s, social movements and patient and family pressure, led to the inclusion of rare diseases in the public health agenda and, in 2014, Brazil's Ministry of Health published the Ordinance n ° 199, which established the National Comprehensive Care for People with Rare Diseases. It established the principles and guidelines for the integral care of these patients within the scope of the Unified Health System, and which diagnosis methods should be available. The aim of this work was to establish the contribution of the different methods for cytogenetic, molecular and clinical diagnosis, in the diagnostic elucidation of patients assisted at the Medical Genetic Service of the Hospital Universitário de Brasília, aiming to evaluate the improvement in diagnosis with the implementation of this Ordinance. For that, we evaluated medical records of 299 patients, regarding sex, age, reason for referral, complementary genetic tests and whether diagnosis was conclusive based on these methods or clinical presentation. Clinical diagnosis was possible in 17.7% of the patients. The karyotype contributed to the diagnosis in 14%, chromosomal analysis by microarray (CMA) in 6.35%, mutation screening in *FMR1* to investigate the Fragile- X syndrome in 0.66%, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in 0,33%. Sixty percent of the patients remained undiagnosed. The diagnostic yield of these tests was in agreement with those published elsewhere in literature. The examinations provided in Ordinance GM/MS n° 199/2014 increased the diagnostic possibility, but the delay in Ordinance's publication meant led to newest genetic tests being left out, which would increase the chance of diagnosis, especially for the monogenic diseases.

**Keywords:** rare diseases, Ordinance n ° 199/14, karyotype, CMA, *FMR1*, MLPA.

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1. Cariótipo masculino normal.....	17
Figura 2. Identificação de uma sequência pelo método FISH.....	19
Figura 3. Análise de DNA pela técnica de Southern Blot.....	20
Figura 4. Sequenciamento de Sanger.....	21
Figura 5. Amplificação de uma sequência pela técnica de PCR.....	23
Figura 6. Análise pela técnica de MLPA.....	24
Figura 7. Hibridização Genômica Comparativa.em <i>arrays</i> .....	26
Tabela 1. Idade dos pacientes na primeira consulta.....	35
Tabela 2. Motivos de encaminhamento.....	36
Tabela 3. Resultados dos cariótipos alterados.....	38
Tabela 4. Resultados dos cariótipos normais que permitiram exclusão da hipótese diagnóstica.....	40
Tabela 5. Solicitações e resultado do MLPA.....	45
Tabela 6. Resultados alterados do CMA.....	46
Tabela 7. Comparação diagnóstica BAC/Oligonucleotídeos .....	48
Tabela 8. Contribuição dos diferentes métodos diagnósticos.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH	Hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos
ADNPM	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor
BACs	Cromossomos bacterianos artificiais ( <i>Bacterial Artificial Chromosomes</i> )
CMA	Análise cromossômica por microarranjos ( <i>Chromosomal Microarray Analysis</i> )
CNVs	Variações no número de cópias ( <i>Copy Number Variations</i> )
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ddNTPs	Dideoxynucleotídeos
dNTPs	Deoxynucleotídeos
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> )
GWAS	Estudos de associação genômica ampla ( <i>Genome-wide association study</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
PNH	Programa Nacional de Humanização
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação multiplex ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> )
MS-MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação multiplex sensível à metilação.
MSP	Reação em cadeia da polimerase sensível a metilação
NGS	Sequenciamento de nova geração ( <i>Next-generation Sequencing</i> )
qMSP	Reação em cadeia da polimerase em tempo real sensível a metilação
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
OMS	Organização Mundial da Saúde



PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo ( <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> )
HUB	Hospital Universitário de Brasília
TEA	Transtorno do espectro autista
UnB	Universidade de Brasília
VUS	Variante de significado desconhecido ( <i>Variant of Uncertain Significance</i> )
WES	Sequenciamento completo do exoma ( <i>Whole-exome Sequencing</i> )
WGS	Sequenciamento completo do genoma ( <i>Whole-genome Sequencing</i> )

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Exames genéticos realizados pelo SUS e previstos na Portaria GM/MS nº199/2014.....	16
1.1.2 Cariótipo.....	16
1.1.3 Identificação de uma sequência específica de DNA por FISH.....	18
1.1.4 Análise de DNA pela técnica de Southern Blot.....	19
1.1.5 Pesquisa de mutação por sequenciamento pelo método de Sanger .....	20
1.1.6 Identificação de mutações e rearranjos por PCR, qPCR, MSP e qMSP.....	21
1.1.7 Análise de DNA pela técnica de MLPA.....	23
1.1.8 Identificação de alterações submicroscópicas por aCGH.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Exames genéticos.....	30
4.1.1 Cariótipo convencional.....	31
4.1.2 Extração de DNA para realização de exames moleculares.....	31
4.1.2.1 Pesquisa de mutações em FMR1 realizada por PCR.....	32

4.1.2.2 MLPA .....	32
4.1.2.3 CMA.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	61
ANEXO I.....	61
ANEXO II.....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Em janeiro de 2014 foi publicada pelo Ministério da Saúde a Portaria GM/MS nº 199, que institui a Política Nacional de Atenção Integral às pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde. Posteriormente alterada pela Portaria GM/MS nº 981 de 2014, este conjunto de normas estabelece as diretrizes e os incentivos financeiros de custeio para o cuidado integral e multidisciplinar de pessoas com doenças raras (BRASIL, 2014).

Para efeitos desta Portaria, uma doença é considerada rara quando afeta 1,3 pessoas para cada 2.000 indivíduos. Assim mesmo, a Portaria organiza o cuidado destas pessoas segundo a etiologia das doenças raras, classificando-as em dois eixos. No primeiro eixo, encontram-se as doenças raras de origem genética, o que corresponde a 80% do total. No segundo eixo, estão alocadas as doenças raras não genéticas e doenças raras infecciosas, inflamatórias e autoimunes (BRASIL, 2014).

A etiologia das doenças raras de origem genética é variada e pode ser dividida em cromossomopatias, doenças monogênicas, doenças multifatoriais e doenças genéticas de células somáticas (WHO, 2000; RIMOIN; PYERITZ; KORF, 2013).

As cromossomopatias se caracterizam por uma variação no número ou estrutura dos cromossomos, com uma frequência de rearranjos estruturais e de aneuploidias em recém-nascidos vivos de aproximadamente 9,2/1.000 e 3/1.000, respectivamente. Este número é ainda maior se considerarmos os casos de aborto espontâneo e os natimortos (RIMOIN; PYERITZ; KORF, 2013).

As doenças monogênicas surgem a partir de mutações em um ou nos dois alelos de um gene de um autossomo ou cromossomo sexual ou em um gene mitocondrial. Não existem dados precisos acerca da frequência desse tipo de alteração, mas trabalhos iniciais estimaram uma incidência global de traços autossômicos dominantes de 7/1.000 nascidos vivos, traços autossômicos recessivos de 2,5/1.000 nascidos vivos, e doenças ligadas ao cromossomo X de 0,5/1.000 nascidos vivos. A frequência combinada destas é de 10/1.000 nascidos vivos (1%). Cabe destacar que esse número praticamente dobrou com o

reconhecimento de novas entidades, o avanço na tecnologia do DNA (que permitiu identificar indivíduos assintomáticos portadores de mutações), o fato de que diferentes mutações em um mesmo gene podem causar diferentes quadros clínicos, o diagnóstico de doenças de surgimento em idade mais avançada e a sobreposição com as doenças multifatoriais (RIMOIN; PYERITZ; KORF, 2013).

As doenças multifatoriais resultam da interação de um ou mais genes com um ou mais fatores ambientais. Acredita-se que cerca de metade de todas as malformações congênitas e muitas doenças crônicas comuns nos adultos, como hipertensão, psicose e aterosclerose se enquadrem nesse grupo de doenças (RIMOIN; PYERITZ; KORF, 2013).

Finalmente, as doenças genéticas de células somáticas incluem as mutações que originam células cancerígenas e o mosaicismo somático ou germinativo para doenças monogênicas (RIMOIN; PYERITZ; KORF, 2013).

Embora as doenças genéticas sejam raras individualmente, podem ser consideradas relativamente frequentes em conjunto. Em 1999 um grupo de assessores da Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou a epidemiologia das doenças congênitas e genéticas e indicou que a carga das doenças congênitas nos países em desenvolvimento é tanto ou maior que nos países desenvolvidos (WHO, 2000). Cada ano, 7,6 milhões de crianças no mundo, nasce com alguma doença genética ou defeito congênito; 95% destas crianças são habitantes de países em desenvolvimento (MARQUES-DE-FARIA et al., 2004). No Reino Unido, estas doenças afetam de 1 a 2% dos nascidos vivos e, nos Estados Unidos, aproximadamente 2,5% (ABOUT..., 2018; PREVALENCE..., 2018). Considerando todas as faixas etárias, entre 6 e 8%, isto é, de 420 a 560 milhões de pessoas, são portadoras de uma doença genética. Por essa estimativa, teríamos no Brasil um total de 13 milhões de afetados (INTERFARMA, 2013, p. 8). Neste país, numa análise baseada em dados levantados do DATASUS, 0,65% dos nascidos vivos foram registrados como tendo uma anomalia congênita; contudo, estima-se que este valor não é confiável devido a discordâncias entre as declarações de óbito em decorrência de malformações congênitas e as declarações de nascidos vivos (HOROVITZ, 2011).

Das aproximadamente 7.000 doenças raras já descritas, 75% se manifestam nos primeiros cinco anos de vida e 95% não possuem tratamento, requerendo cuidados em serviços especializados e de reabilitação. Assim, estes números demonstram a necessidade do estabelecimento de políticas públicas para lidar com a problemática das doenças raras (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018; INTERFARMA, 2013).

Apesar destes dados, até algumas décadas atrás as doenças raras não contavam dentre as prioridades dos serviços de saúde. Movimentos sociais e a pressão de pacientes e familiares levaram a que este panorama começasse a mudar. Podem-se identificar dois fatores que contribuíram neste processo. Por um lado a diminuição, no Brasil e no mundo, da mortalidade infantil associada a causas infecciosas e nutricionais, levando a um maior destaque das doenças congênitas como causa de morbimortalidade para essa faixa etária (UNICEF, 2013; BRYCE; VICTORA; BLACK, 2013; VIEIRA, 2012). Do outro, o enorme avanço do campo da genética. O anúncio e posterior publicação do sequenciamento do genoma humano em 2001 teve como resultado um maior conhecimento das bases moleculares da vida e da tecnologia do DNA, com a conseqüente melhora na área da saúde de forma global. Este aumento da informação disponível trouxe benefícios nas áreas de prevenção, diagnóstico e manejo das doenças genéticas, associados a uma crescente preocupação com as questões éticas e legais relacionadas à pesquisa genômica, assim como com a possibilidade de que este desenvolvimento aumentasse o distanciamento entre países com altos e baixos recursos (WHO, 2002; ALWAN; MODELL, 2003). Historicamente e de forma errônea, os serviços de genética têm sido associados a tecnologias de alto custo, sem levar em consideração que o reconhecimento e a prevenção das doenças genéticas, em verdade diminuem os valores gastos com a saúde dos indivíduos portadores deste tipo de doenças. Isso explica que esforços globais tenham sido realizados para assegurar que uma maior parcela da população tenha acesso à prevenção e ao melhor cuidado possível das doenças genéticas e defeitos congênitos, assim como para o fortalecimento dos laços entre os serviços de genética e a atenção primária.

Segundo a OMS, é necessário conhecer a epidemiologia das doenças genéticas em uma determinada região, para a sua abordagem e controle, de forma que seja possível identificar áreas prioritárias para intervenção, planejamento e

desenvolvimento de sistemas educativos e de supervisão (MARQUES-DE-FARIA et al., 2004; WHO, 2000) .

Em 2002, um grupo de cientistas de diferentes países publicou uma série de recomendações para o estabelecimento de serviços de genética e para a introdução de uma abordagem molecular tanto no sistema de saúde como na área de pesquisa, tendo como foco principal os países de baixos recursos (ALWAN; MODELL, 2003).

Para o estabelecimento de serviços de genética, consideraram necessária a criação de um grupo de médicos treinados e acesso a métodos diagnósticos citogenéticos, bioquímicos e moleculares (ALWAN; MODELL, 2003).

Como recomendações, estabeleceram quatro estratégias principais: nomear um representante do Ministério da Saúde para coordenar as atividades em Genética Médica; criar uma equipe multidisciplinar para a realização das tarefas em colaboração com o coordenador nacional; compartilhar o conhecimento e o desenvolvimento entre as diferentes regiões do país; coletar dados e publicar os resultados dos programas (ALWAN; MODELL, 2003).

Nesse contexto, começaram a serem discutidas em diferentes lugares do mundo, políticas públicas de abordagem à questão das doenças raras, com a criação, por exemplo, do Programa Nacional Português para Doenças Raras e o Plano Nacional Francês para Doenças Raras. Além disso, as legislações vigentes referentes às doenças raras tanto nos Estados Unidos como em países membros da União Europeia, são orientadas por diretrizes do *Orphan Drug Act*, de 1983, com emendas posteriores, e pela *Resolution EC n° 141/2000* (SOUSA; SÁ, 2015).

No Brasil, desde o ano 2001 começaram a ser discutidas as políticas públicas específicas para as doenças raras. Em 2004 o Ministério da Saúde criou um grupo de trabalho que culminou com a publicação, em 20 de janeiro de 2009, da Portaria GM/MS n° 81 que instituiu no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica (BRASIL, 2009). Esta Portaria leva em consideração os dados já mencionados em relação à incidência e prevalência das doenças genéticas e a necessidade de estruturação de uma rede de serviços em genética regionalizada e hierarquizada, no âmbito do SUS, dando atenção à importância do aconselhamento genético e das medidas preventivas e terapêuticas. Considera a necessidade de estabelecer critérios de credenciamento e

habilitação dos serviços e determina as atribuições e competências de cada esfera de governo. Contudo, ainda outros cinco anos se passaram até que uma lei suplementar organizasse e regulasse esta Portaria.

Em 2012 foi criado pelo Ministério da Saúde um outro grupo de trabalho para a formulação de uma Política Nacional de Doenças Raras no SUS, resultando na publicação da Portaria GM/MS nº 199 em 2014 (BRASIL, 2014).

A Portaria GM/MS nº 199, de 30 de janeiro de 2014 (com alterações posteriores pela Portaria GM/MS nº 981, de 2014), institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. Nela ficam estabelecidos os princípios e diretrizes para o atendimento integral destas pessoas no âmbito do SUS. Como referido anteriormente, organiza os cuidados em dois eixos e estrutura as linhas de atenção em Atenção Básica, Atenção Especializada e Atenção Domiciliar. Além disso, estabelece as responsabilidades de cada esfera do governo, indica como ocorrerá a avaliação e monitoramento dos serviços de saúde credenciados e determina questões relativas ao financiamento (BRASIL, 2014).

A Atenção Básica é a porta de entrada preferencial do usuário na rede. É responsável pela coordenação do cuidado e a atenção contínua da população sob seu território de responsabilidade. Seu campo de ação inclui as ações de promoção da saúde, diagnóstico precoce, encaminhamento oportuno, coordenação e manutenção dos cuidados, avaliação de vulnerabilidades, redução de danos, registro de informações, acolhimento, humanização e estruturação dos cuidados domiciliares, todos voltados às pessoas com doenças raras.

A Atenção Especializada compreende locais de atenção com maior acesso à tecnologia e atendimento ambulatorial especializado, de urgências e hospitalar. Estes locais apoiam e complementam os serviços da Atenção Básica e estão compostos pelo Serviço de Atenção Especializada em Doenças Raras e o Serviço de Referência em Doenças Raras. No primeiro, serão oferecidos os cuidados para uma ou mais doenças raras. Nos Serviços de Referência, o atendimento será para doenças raras de, no mínimo, dois eixos assistenciais.

Finalmente, a Atenção Domiciliar, integrada aos dois níveis de atenção previamente descritos, tem o intuito de implantar o acolhimento e a humanização de acordo com a Política Nacional de Humanização (PNH), promover a melhora da



qualidade de vida no ambiente familiar e a autonomia das pessoas com doenças raras, assim como orientar e dar apoio aos familiares e cuidadores destas pessoas.

Além do anterior, a Portaria GM/MS nº 199/2014 também estabelece os procedimentos relacionados ao atendimento das pessoas com doenças raras, determinando como deve estar composta a equipe de profissionais e quais são os exames que devem ser garantidos. Dentre os exames de análise de DNA se encontram: análise de DNA pelas técnicas de Southern Blot e amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação multiplex (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*); identificação de mutações e rearranjos por reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), PCR sensível a metilação (MSP), PCR em tempo real (qPCR) e PCR em tempo real sensível a metilação (qMSP); identificação de sequência específica de DNA por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*); identificação de alteração submicroscópica por hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (aCGH) e pesquisa de mutação por sequenciamento pelo método de Sanger de uma sequência de DNA de até 500 pares de bases. O cariótipo não consta na Portaria porque já formava parte dos procedimentos realizados pelo SUS.

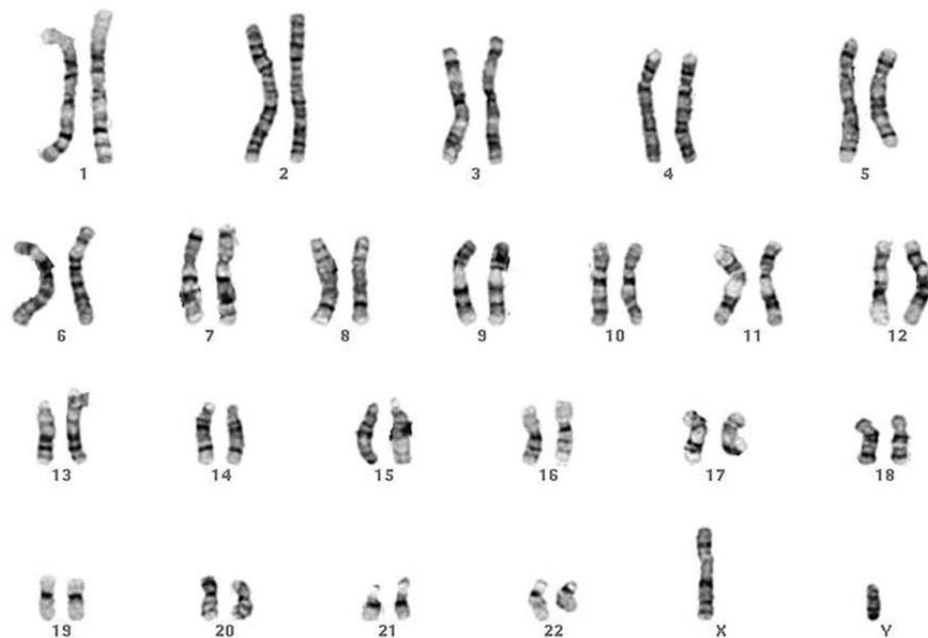
## **1.1 Exames genéticos realizados pelo SUS e previstos na Portaria GM/MS nº199/2014**

### **1.1.2 Cariótipo**

A palavra cariótipo se refere à constituição cromossômica das células somáticas de um indivíduo; a representação gráfica dos cromossomos é chamada de cariograma (BEIGUELMAN, 1982). Na década de 1950 começaram a serem desenvolvidas diferentes técnicas que melhoraram a identificação dos cromossomos e em 1959 foi demonstrada a aplicação médica, com o descobrimento das bases cromossômicas da Síndrome Down, Klinefelter e Turner (McKINLAY GARDNER; SUTHERLAND; SHAFFER, 2012). A partir de 1970 foram desenvolvidas várias técnicas de coloração dos cromossomos que permitiram identificar diferentes regiões nas cromátides, as bandas cromossômicas, e assim, estender o uso deste exame na prática clínica. O método convencional de análise dos cromossomos através do

cariótipo é aquele obtido a partir da cultura de linfócitos de sangue periférico, com a técnica de bandeamento G e análise em microscópio óptico. Possibilita a detecção de anomalias cromossômicas, isto é, aneuploidias (alteração no número de cromossomos) e rearranjos estruturais, porém tem como limitação o baixo limite de resolução (5-10Mb) e a necessidade de cultura de células.

As indicações para a realização da análise cromossômica são infertilidade conjugal, aborto recorrente, distúrbios da diferenciação sexual, história familiar de anomalia cromossômica, análise cromossômica fetal nos casos de gestação em mulher de idade avançada (acima dos 35 anos), natimorto, neoplasias (em amostras tumorais ou da medula óssea), baixa estatura, déficit de crescimento, fácies dismórfica, atraso no desenvolvimento e deficiência mental. Até o surgimento e maior disponibilidade da análise cromossômica por microarranjos, o cariótipo era considerado o primeiro exame a ser realizado em indivíduos com deficiência mental e/ou malformações congênicas múltiplas, conseguindo detectar alguma anomalia em 3% desses casos, excluindo a Síndrome Down e outras síndromes cromossômicas bem definidas (Figura 1).



**Figura 1. Cariótipo masculino normal.**

### 1.1.3 Identificação de uma sequência específica de DNA por FISH

A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) foi descrita pela primeira vez por Gall & Pardue em 1969. É um método de citogenética molecular baseado na utilização de uma sonda de DNA, que é um fragmento de DNA clonado, e sua ligação à sequência alvo. Inicialmente, a sonda é marcada de forma direta ou indireta. Para a marcação direta se utilizam nucleotídeos modificados contendo um fluoróforo. Na marcação indireta, os nucleotídeos modificados contêm um hapteno. A seguir, a sonda marcada e a sequência alvo são desnaturadas e, posteriormente, a combinação delas permite o anelamento por complementaridade de bases. Os híbridos formados entre as sondas marcadas e as sequências alvo nos cromossomos fixados em lâminas, podem ser detectados no microscópio de fluorescência (O'CONNOR, 2008) (Figura 2).

Esta técnica permite a detecção de sequências específicas nos cromossomos e auxilia no diagnóstico de alterações cromossômicas, tais como deleções, duplicações e translocações, como por exemplo: identificação dos pontos de quebra nas translocações, detecção do rearranjo *BCR-ABL* na leucemia mieloide crônica, duplicação no cromossomo 17 na doença Charcot-Marie-Tooth tipo 1A, pesquisa de deleções subteloméricas, pesquisa da síndrome de deleção 22q11.2 (Síndrome DiGeorge/Velocardiofacial).

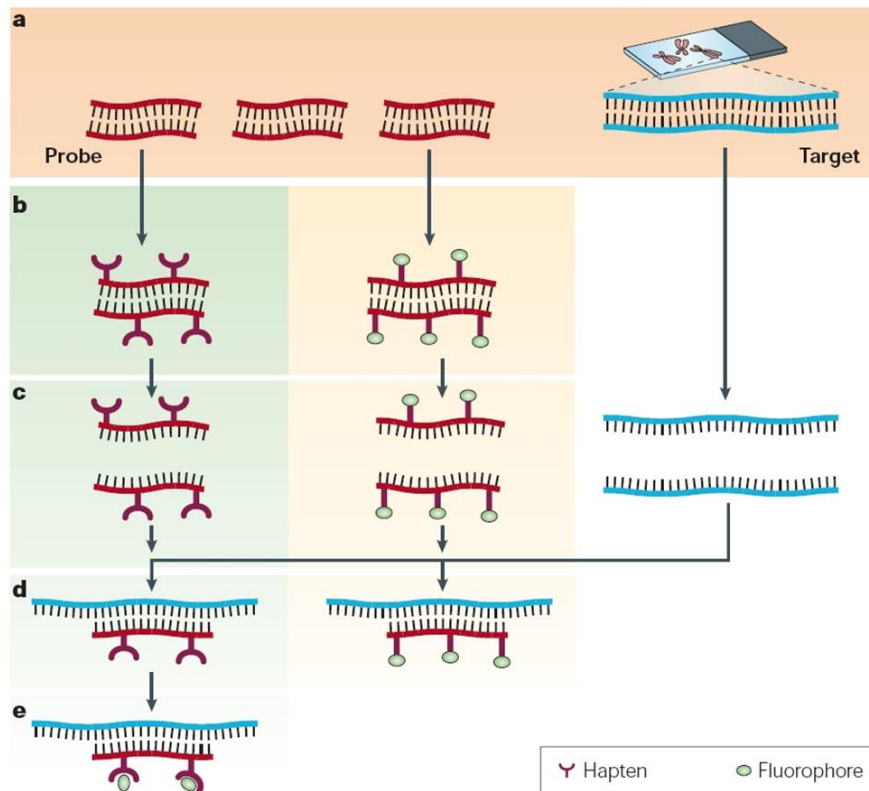


Figura 2. Identificação de uma sequência pelo método FISH: a) sondas e sequência alvo, b) marcação da sonda com hapteno (hapten) ou fluoróforo (fluorophore), c) desnaturação da sonda e da sequência alvo, d) hibridação, e) reconhecimento do hapteno (De O'Connor C; Fluorescence In Situ Hybridization. Nature Education, 2008).

#### 1.1.4 Análise de DNA pela técnica de Southern Blot

Descrita por Southern em 1975, esta técnica permite a detecção de sequências específicas de fragmentos de DNA. Para isso, o DNA genômico é digerido por enzimas de restrição e posteriormente os fragmentos são separados em diferentes tamanhos mediante a eletroforese em gel de agarose. A seguir, a fita de DNA é desnaturada com o uso de uma solução alcalina e transferida para uma membrana de nylon ou nitrocelulosa por capilaridade. Os fragmentos de DNA são imobilizados na membrana e hibridizados com sondas marcadas (radioativas, fluorescentes ou cromogênicas), complementares à sequência de interesse. Finalmente, diferentes técnicas de detecção da sonda permitem analisar se a sequência de interesse está ou não presente na amostra analisada (SOUTHERN, 1975) (Figura3).

O Southern Blot pode ser usado para determinar o tamanho de um fragmento de restrição em particular, estudar rearranjos gênicos normais, rearranjos cromossômicos ou translocações em oncogenes em células tumorais e para determinar o número de cópias de um gene no genoma (GLENN; ANDREOU, 2013). Tradicionalmente, associado à PCR, era considerado o método padrão ouro para o diagnóstico da Síndrome do X-frágil (TASSONE, 2015). Hoje essa técnica é pouco utilizada por ser de alto custo, trabalhosa e, em muitos casos, fazer uso de isótopos radioativos, o que requer uma estrutura laboratorial adaptada para tal.

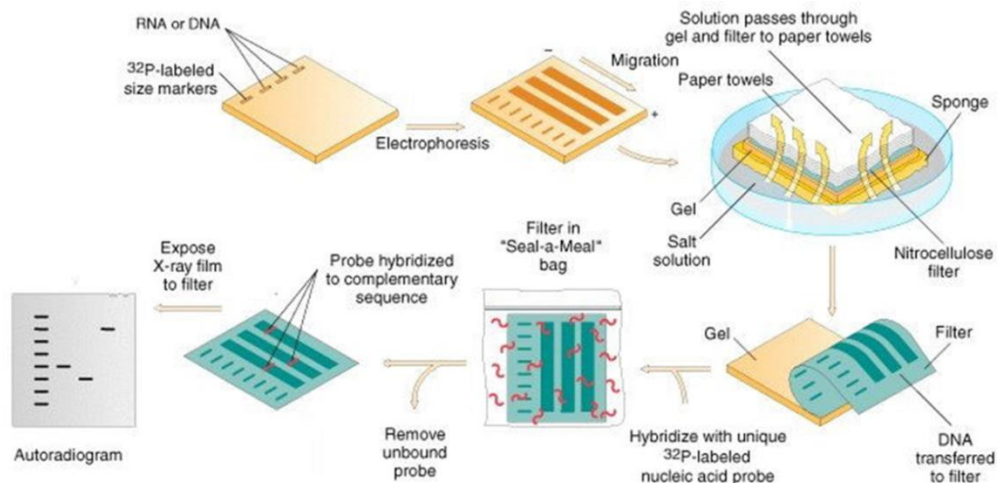
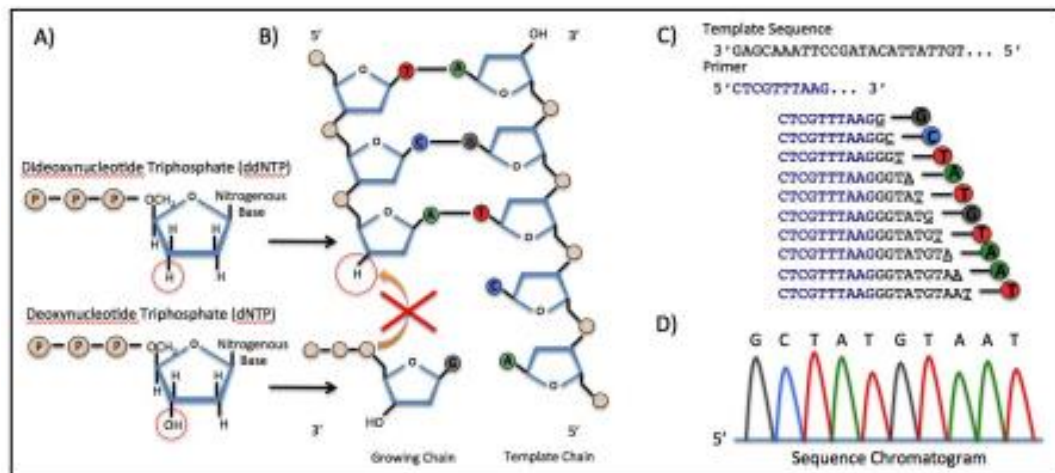


Figura 3. Análise de DNA pela técnica de Southern Blot. (De Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M; Recombinant DNA. 2d ed. Scientific American Books, 1992).

### 1.1.5 Pesquisa de mutação por sequenciamento pelo método de Sanger

Descrito por Sanger em 1977, este método permite determinar a sequência de nucleotídeos na cadeia de DNA. Chamada também de técnica dideoxi ou de “terminação da cadeia”, o princípio se fundamenta no uso de análogos químicos de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), os dideoxinucleotídeos trifosfato (ddNTPs), nucleotídeos sem o grupo 3' hidroxil, necessário para a extensão das cadeias de DNA. Assim, o dNTP não pode formar uma ligação com o grupo 5' fosfato do seguinte dNTP. Misturando ddNTPs marcados com diferentes fluorescências e dNTPs à reação de síntese de DNA se tem como resultado a formação de cadeias

de DNA de diferentes tamanhos, devido a que os ddNTPs se ligam aleatoriamente à cadeia em construção. Os fragmentos de DNA são separados por tamanho e, finalmente, a sequência resultante é analisada em um cromatograma (Figura 4).



**Figura 4. Sequenciamento de Sanger:** A) comparação entre dideoxinucleotídeo trifosfato (ddNTP) e deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), o primeiro com hidrogênio (H) e o segundo com o grupo hidroxila (OH) na posição 3'. B) A ligação de ddNTP impede a extensão da cadeia de DNA. C) Os fragmentos de DNA são separados por tamanho. D) Análise da sequência em um cromatograma (Modificado de McGovern R, Thesis at ResearchGate, 2015).

### 1.1.6 Identificação de mutações e rearranjos por PCR, qPCR, MSP e qMSP

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi descrita pela primeira vez em 1985 por Saiki *et al.* e por Mullis e Faloona em 1987, como método para amplificar a sequência genômica da beta globina, para o diagnóstico da doença falciforme. Pode-se dizer que é uma técnica para copiar DNA *in vitro*, já que permite a multiplicação de uma sequência específica desse ácido nucleico em até  $10^6$  vezes (Figura 5). A PCR é amplamente utilizada em biologia molecular e desde a sua descrição, várias modificações foram introduzidas à técnica original, o que possibilitou ainda mais seu uso extensivo na área. Pode ser utilizada para pesquisa de rearranjos cromossômicos, variações nas sequências de nucleotídeos, sequenciamento direto do DNA genômico e mitocondrial e para a detecção de patógenos (ELKINS, 2015).

A PCR em tempo real (RT-PCR) é um método semi-quantitativo (qPCR) que permite a visualização direta dos produtos da PCR mediante a adição de sondas fluorescentes à reação, e a utilização de um equipamento capaz de detectar a

fluorescência. É um método sensível e rápido utilizado tanto na pesquisa de patógenos como para a detecção de mutações ou de polimorfismos de um único nucleotídeo (HAAS; TORRES, 2016; MATSUDA, 2017).

As técnicas sensíveis à metilação são utilizadas principalmente para pesquisa de metilação aberrante em genes associados a câncer (HERMAN et al., 1996; LILOGLOU; NIKOLAIDIS, 2013).

A PCR metilação específica (MSP) é um método de PCR sensível e específico para a detecção do estado de metilação de sítios CpGs dentro de uma ilha CpG. Inicialmente, o DNA é tratado com bissulfito, convertendo químicamente citocinas não metiladas em uracilo. Subsequentemente, para a amplificação, são utilizados *primers* que distinguem regiões metiladas de regiões não metiladas. Finalmente, a presença ou ausência de alelos metilados é avaliada qualitativamente através da eletroforese em gel dos produtos da PCR. (HERMAN et al.; GALRÃO, 2011).

A PCR quantitativa metilação específica (qMSP) consiste na técnica da RT-PCR associada à MSP, o que possibilita quantificar a metilação. O ensaio foi designado para amplificar especificamente sequências de DNA metiladas tratadas com bissulfito. Para isso, são utilizados pares de *primers* associados a sondas fluorescentes, um par *primer-sonda* dirigido à pesquisa da sequência metilada de interesse e um segundo par como controle interno. O nível de metilação corresponde à relação entre o valor da amplificação da sequência de interesse e a do controle interno (GALRÃO, 2011).

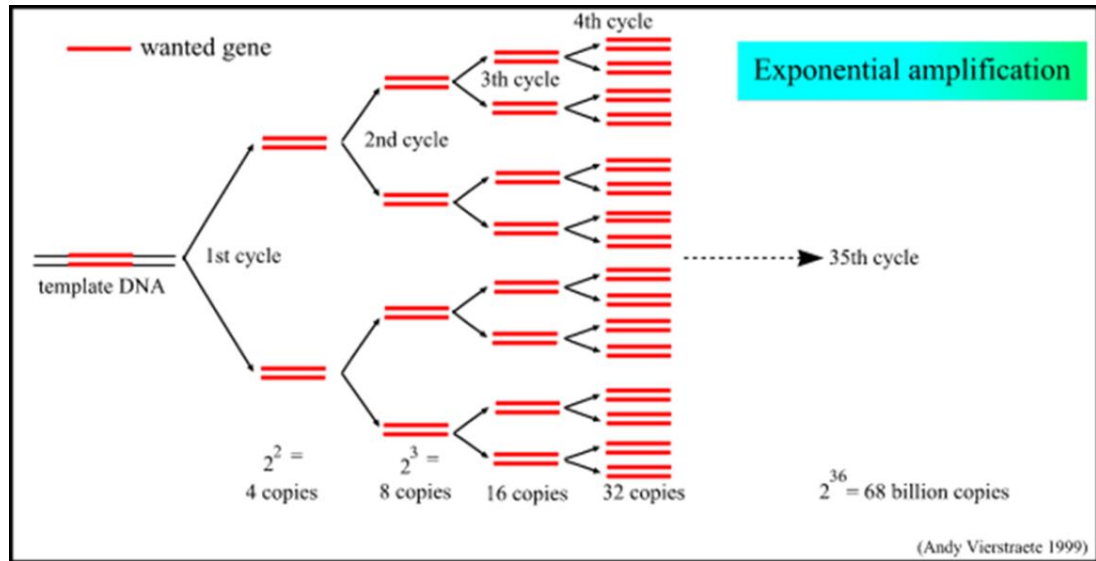


Figura 5. Amplificação de uma sequência pela técnica de PCR (De Vierstraete A, 1999).

### 1.1.7 Análise de DNA pela técnica de MLPA

É um método que permite detectar pequenas mudanças no número de cópias de até sessenta sequências genômicas de DNA em uma única reação. É utilizado principalmente para o diagnóstico de síndromes de microdeleção, deleções subteloméricas e duplicações, assim como para análise de regiões genômicas complexas (pseudogenes) e do estado de metilação em regiões sujeitas a *imprinting* genômico. Inicialmente é realizada a desnaturação do DNA. A seguir, a sequência alvo na fita de DNA é hibridizada com sondas que serão ligadas e amplificadas por PCR. Posteriormente os fragmentos são separados por eletroforese capilar e finalmente, são comparados os picos obtidos com amostras de referência, indicando quais sequências mostram um número aberrante de cópias (Figura 6).

Os usos do MLPA são múltiplos, os principais são a investigação de síndromes de predisposição ao câncer, doenças neuromusculares, síndromes com deficiência intelectual e malformações congênitas, aberrações cromossômicas e detecção do padrão de metilação em células normais e em amostras de tumores sólidos.

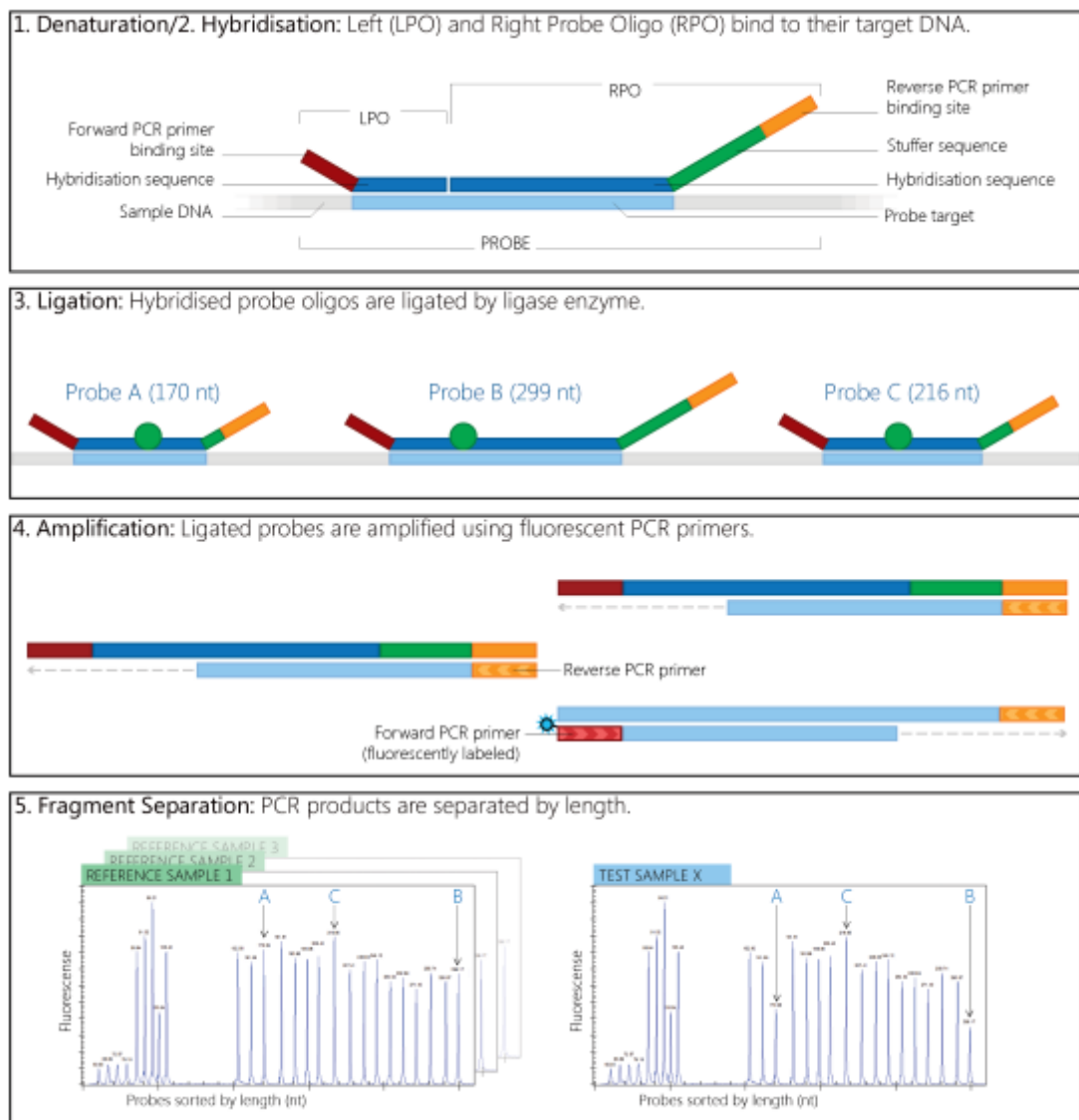
Trata-se de um método diagnóstico rápido, fácil de ser interpretado, com uma boa relação custo-benefício, capacidade de detectar variações de até um único nucleotídeo e com a vantagem de que podem ser realizadas até 96 análises ao



mesmo tempo, com *kits* comerciais para mais de 400 aplicações (EIJK-VAN OS; SCHOUTEN, 2011).

O MLPA pode ser utilizado como método de rastreamento de variações de número de cópias buscando, por exemplo, alterações subteloméricas; ou pode ser usado como teste confirmatório quando há suspeita de doença genética específica.

O MS-MLPA, variante da técnica que permite a detecção do padrão de metilação de sequências de interesse, é hoje considerado o padrão ouro para diagnóstico de diversas síndromes genéticas como as síndromes de Prader-Willi e Angelman, e de Beckwith-Wiedemann e Silver-Russell.



Continua

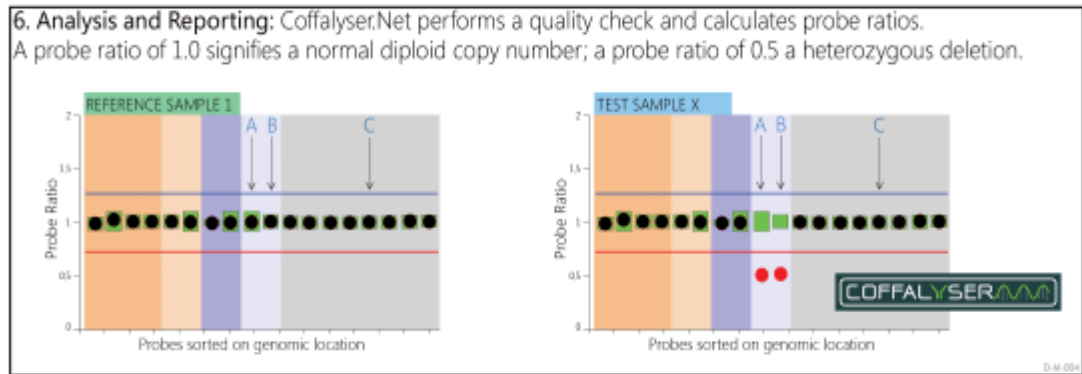


Figura 6. Análise pela técnica de MLPA: 1. Desnaturação. 2. Hibridação. 3. Ligação. 4. Amplificação. 5. Separação de fragmentos. 6. Análise e reporte de dados (De MRC-Holland MLPA®, disponível na página web da empresa).

### 1.1.8 Identificação de alterações submicroscópicas por aCGH

A hibridização genômica comparativa (CGH) tem sido utilizada desde a década de 1990 para a detecção de alterações genômicas em amostras tumorais (SOLINAS-TOLDO et al., 1997). Em 2003 foi publicada a construção e aplicação de microarranjos ou *microarrays* de todo o genoma, para a identificação de microdeleções e microduplicações, novas e já conhecidas, em pacientes com deficiência mental e malformações. Pela técnica, amostras de DNA de interesse e amostras controle, são marcadas com um corante fluorescente e hibridizadas a um microarranjo, tipicamente uma lâmina de vidro. Calculando a relação entre a intensidade de sinal da amostra de interesse e a do controle, perdas e ganhos de material cromossômico podem ser identificados (VISSERS, 2003).

Para a realização do aCGH, inicialmente eram utilizados segmentos de DNA clonados em cromossomos bacterianos artificiais (BACs, *Bacterial Artificial Chromosomes*), mas ao longo dos últimos anos, os avanços e o desenvolvimento da técnica, permitiram que a maioria dos laboratórios, tanto os de análises clínicas como os de pesquisa, passasse a se valer do uso de oligonucleotídeos sintéticos e arranjos (*arrays*) de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) para a pesquisa de variações no número de cópias no genoma humano (CNVs, *Copy Number Variations*). Os oligonucleotídeos sintéticos permitem aumentar o nível de resolução e a customização do microarranjo, e a

variedade de opções levou a que a técnica seja denominada, em conjunto, análise cromossômica por microarranjos (CMA, *Chromosomal Microarray Analysis*) (BRADY; VERMEESCH, 2012).

Essa técnica permite um rastreio de todo o genoma para deleções e duplicações e constitui hoje o principal método de investigação de alterações cromossômicas em pacientes sem suspeita clínica de síndrome genética definida. Em alguns centros no exterior, principalmente na Europa, o CMA é o exame de primeira linha para pacientes com doenças genéticas sendo realizado antes mesmo do exame de cariótipo. Essa escolha se deve ao alto poder de detecção da técnica, de aproximadamente 15 a 25% de alterações em pacientes com malformações congênicas e deficiência intelectual (MILLER et al., 2010) e a falta de pessoal capacitado para a análise do cariótipo.

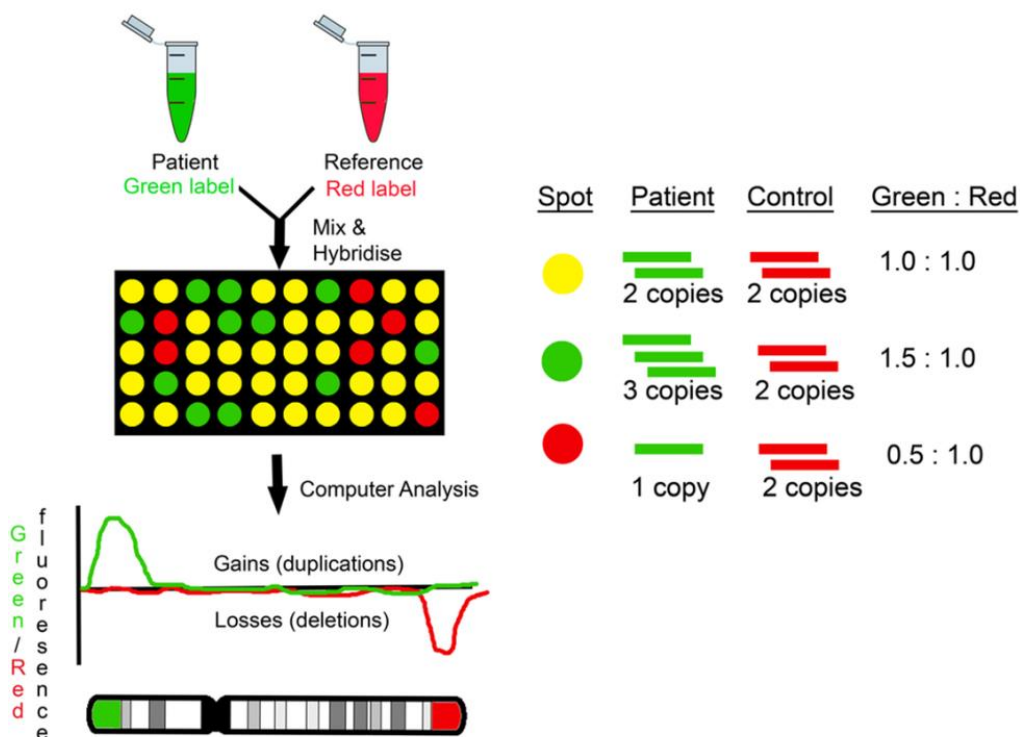


Figura 7. Hibridização Genômica Comparativa em arrays, aCGH (De Karampetsou, J.Clin. Med, 2014)

Em definitiva, a Portaria GM/MS nº 199/2014, garante a disponibilidade de métodos para pesquisa, principalmente, de síndromes cromossômicas e de síndromes que cursam com deficiência mental e malformações congênitas múltiplas, como a Síndrome do X-frágil, síndromes de microdeleções, microduplicações e com padrão de metilação anormal. Para a detecção de alterações gênicas, oferece técnicas que permitem a análise de um único gene e uma única mutação por ensaio, como a PCR e o sequenciamento pelo método de Sanger, este último sendo um método caro e laborioso para o estudo de genes com maior número de éxons. Assim, a demora na publicação desta Portaria quando comparada às políticas públicas adotadas em outros lugares do mundo, fez com que não tenham sido contemplados métodos de diagnóstico genético mais modernos e eficazes, como o sequenciamento de nova geração para análise completa do exoma e realização de painéis de genes, e exames moleculares para a Síndrome do X-frágil sem necessidade do uso de Southern Blot.

## 2. JUSTIFICATIVA

De acordo com as recomendações da OMS é necessário conhecer a epidemiologia das doenças genéticas em uma determinada região para o planejamento, a melhor alocação de recursos, supervisão e educação de todos os atores envolvidos nos cuidados das pessoas com doenças raras.

Este trabalho visa fornecer um panorama das doenças genéticas atendidas no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília (HUB), a contribuição da avaliação médica especializada e dos exames citogenéticos e moleculares no diagnóstico deste tipo de doenças e a identificação dos recursos disponíveis e necessários para o funcionamento de um Centro de Referência em Doenças Raras neste hospital. Cabe destacar que este é o primeiro e único estudo com essas características a ser realizado na região.

Assim, os resultados gerados permitirão conhecer a epidemiologia das doenças congênitas no Serviço; colaborar com a definição de prioridades na área; selecionar entre as possíveis intervenções; avaliar os recursos requeridos; educar e treinar profissionais e, finalmente, atuar na área de prevenção desse tipo de doenças.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer a contribuição de diferentes metodologias de diagnóstico clínico, citogenético e molecular na elucidação diagnóstica em pacientes usuários do Sistema Único de Saúde atendidos no Serviço de Genética Médica do HUB, visando avaliar a melhora no diagnóstico com a implantação da Portaria GM/MS nº 199/2014.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Traçar o perfil epidemiológico dos indivíduos atendidos no Serviço de Genética Médica do HUB.

3.2.2 Quantificar os exames complementares genéticos realizados.

3.2.3 Avaliar se foi possível o esclarecimento diagnóstico apenas com exame clínico ou com a realização de exame genético.

3.2.4 Comparar o rendimento diagnóstico dos exames genéticos realizados no Serviço de Genética Médica do HUB com os dados da literatura.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Estudo observacional, transversal e retrospectivo, baseado na análise de 302 prontuários correspondentes a indivíduos atendidos pela primeira vez no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília durante o período de oito de novembro de 2013 a primeiro de dezembro de 2014. Para fins da análise da amostra, foram desconsideradas as avaliações e exames complementares de familiares dos probandos. Assim, foram avaliados o sexo, a idade dos indivíduos e o motivo do encaminhamento para traçar um perfil epidemiológico dos pacientes atendidos no Serviço, os exames complementares genéticos realizados e se foi possível chegar a um diagnóstico apenas pelo exame clínico ou através destes métodos diagnósticos.

Os dados foram colhidos e analisados em tabela Microsoft® Excel Office 2010, onde constava o número de cadastro na pesquisa, número do prontuário, nome, sexo, data de nascimento, resumo clínico, hipótese diagnóstica, extração de DNA, exame genético complementar realizado, se foi possível a confirmação diagnóstica e com quê método.

Os responsáveis dos pacientes, que aceitaram participar do estudo “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico”, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim mesmo, permitiram a coleta de sangue do probando e, se preciso dos familiares, para a realização de exames moleculares e a publicação dos dados e fotos em reuniões e publicações científicas (Anexo I).

Este trabalho foi aprovado do pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo II)

### **4.1 Exames genéticos**

Para a quantificação e avaliação do rendimento diagnóstico dos exames genéticos realizados no Serviço de Genética Médica do HUB, foram colhidos os dados constantes nos prontuários dos pacientes, a respeito dos exames realizados e solicitados segundo critério médico. Os exames disponíveis no Laboratório de Genética Clínica da Universidade de Brasília (UnB) são: cariótipo convencional com

bandeamento G e com pesquisa de quebras cromossômicas, pesquisa de mutações em FMR1 (Síndrome do X-frágil) realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação multiplex (MLPA - *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) e análise cromossômica por microarranjos (CMA - *Chromosomal Microarray Analysis*).

#### **4.1.1 Cariótipo convencional**

Para análise cromossômica foi realizada a cultura de linfócitos, obtidos a partir de sangue periférico misturados com meio de cultura RPMI, fitohemaglutinina, soro fetal bovino e antibiótico estreptomicina ou penicilina. Após aproximadamente 72 horas, foi acrescentada colchicina à cultura e posteriormente foi efetuada a hipotonização. O material obtido foi gotejado nas lâminas e tratado com tripsina em solução salina. Finalmente, as lâminas foram coradas com uma Solução de Giemsa. A análise foi realizada em microscópio óptico com um índice de resolução de 450 bandas. Os cariótipos foram analisados pela Professora Doutora Iris Ferrari do Laboratório de Genética Clínica da UnB.

Para a pesquisa de quebras cromossômicas foi utilizada mitomicina como agente indutor de quebras e realizada cultura do paciente e de indivíduo controle para se avaliar a porcentagem de quebras cromossômicas obtidas.

#### **4.1.2 Extração de DNA para realização de exames moleculares**

A extração de DNA foi realizada com o método Puregene ([www.puregene.com](http://www.puregene.com)) de acordo com as seguintes etapas: lise celular, precipitação das proteínas e precipitação do DNA. A lise celular foi obtida pela mistura do sangue com as soluções de lise RBC e CLS. A continuação, para a precipitação das proteínas, foi adicionada solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Para a fase de precipitação do DNA foi transferido o sobrenadante para outro tubo contendo 3mL de isopropanol 100%. A mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi retirado. O mesmo procedimento foi realizado mais uma vez, mas com etanol 70% em vez de isopropanol. Finalmente, após 20 min do material ter sido secado foi adicionada solução TE (Tris-HCL e EDTA). O DNA foi armazenado em freezer de 2 a 8°C.



As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, EUA) em concentração de ng/ $\mu$ L.

#### 4.1.2.1 Pesquisa de mutações em *FMR1* realizada por PCR.

Foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região CGG do gene *FMR1*. Na reação de PCR foram utilizados os iniciadores (*primers*) c 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3' e o f 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'. A amplificação foi realizada a partir da mistura do DNA genômico com os dois *primers*, *Deoxyribonucleotide triphosphate* (DNTP), solução 5x Q-solution (Qiagen), Buffer e Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). Procedeu-se com a amplificação mediante 34 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de desnaturação a 98°C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação da amplificação ou não do produto, utilizando uma mistura do material amplificado e uma solução tampão de corrida.

#### 4.1.2.2 MLPA

Para a investigação de deleções ou duplicações nos genes candidatos utilizamos a técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Essa técnica é um método simples, sensível, rápido e econômico que visa a quantificação relativa quanto ao número de cópias de até sessenta sequências de ácidos nucleicos em um experimento.

Para as reações de MLPA, selecionamos *kits* específicos que permitissem a confirmação diagnóstica em pacientes com suspeita de síndromes de microdeleção.

A técnica MLPA permite a identificação do número de cópias de uma dada sequência de DNA por meio da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR. Essas sondas apresentam dois segmentos complementares às sequências-alvo de DNA: um oligonucleotídeo sintético curto e um oligonucleotídeo sintético longo. Este contém uma sequência *stuffer* que varia de tamanho nas diferentes

sondas, permitindo a separação dos diferentes fragmentos por eletroforese capilar. Cada kit é composto de até cinquenta pares de sondas permitindo assim a análise de diversas regiões simultaneamente. Inicialmente as sondas são hibridizadas ao DNA e em seguida os fragmentos são ligados por uma ligase. Após uma nova desnaturação o fragmento formado pela junção das sondas é amplificado por PCR. A reação de PCR é realizada com um único par de *primers*, comum a todas as sondas. Foram seguidos todos os passos e quantidades sugeridas pelo fabricante. Após eletroforese capilar em sequenciador automático, os dados gerados foram analisados no software Coffalyser.

#### **4.1.2.3 CMA**

Foi realizada com a plataforma CytoScan 750 Array (Affymetrix, EUA) e as configurações disponíveis no GeneChip® Scanner 3000 7G System (Affymetrix, EUA). Essa plataforma inclui microarranjos de DNA contendo 550.000 sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, e cerca de 200.000 SNPs. O sistema todo consiste nos oligonucleotídeos pré-arranjados em GeneChip®, um conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e um programa de computação necessário para a identificação dos SNPs e CNVs.

Após estes procedimentos, utilizando o software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) versão 1.2.2 (Affymetrix, EUA) foi possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigose) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido gratuitamente no sítio do fabricante ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) e permite analisar os arquivos gerados pelo software de leitura (Affymetrix CytoScan™ Arrays) dos GeneChip®, visualizar os dados resultantes da análise da hibridização sumarizados em forma de tabelas e gráficos, visualizar os dados da plataforma (CytoScan™ 750 Array) com a qual são comparados os dados das amostras. Além disso, é possível criar e customizar parâmetros e regiões para uma análise específica, aplicar filtros, remover informações não relevantes, realizar análises comparativas entre diferentes amostras, e acessar os principais bancos de dados externos (NCBI, UCSC Genome Browser, Ensembl, MIM®).

Os demais métodos previstos na Portaria GM/MS nº 199/2014 contemplam a realização de exames específicos para cada doença e sua necessidade de realização será discutida posteriormente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 302 prontuários de pacientes atendidos pela primeira vez no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília no período compreendido entre oito de novembro de 2013 e primeiro de dezembro de 2014. Isso representa 29% de um total de 1.040 atendimentos realizados nesse Serviço e 0,18% do total de consultas ambulatoriais realizadas no HUB, que foi de 162.717, todos durante o mesmo período (EBSERH..., 2018). Três prontuários foram excluídos porque não contavam com as informações necessárias para análise. Quanto a sexo, 155 (51,8%) pacientes encaminhados para este Serviço eram do sexo feminino e 144 (48,2%) do sexo masculino. A idade variou entre três dias de vida e 56 anos (Tabela 1). Dos 299 prontuários analisados, 77 (25,75%) pacientes perderam seguimento, 42 (14%) tiveram alta, um foi a óbito (0,33%) e 179 (59,8%) continuam acompanhando no serviço.

Os motivos de encaminhamento foram agrupados em: consulta em reprodução humana, suspeita de erros inatos do metabolismo, síndromes de predisposição ao câncer, deficiência intelectual, transtornos do espectro autista, dismorfias ou suspeita de doença genética sem deficiência intelectual e doenças hematológicas (Tabela 2).

**Tabela 1. Idade dos pacientes na primeira consulta**

<b>Idade na primeira consulta</b>	<b>Número de pacientes/%</b>
NC	13/4
<1mês	34/11
1-12 meses	31/10
>12 meses < 5 anos	55/19
>5 anos <18 anos	110/37
>18 anos	56/19
<b>Total</b>	<b>299/100</b>

**NC: não constava**

**Tabela 2. Motivos de encaminhamento**

<b>Motivos de encaminhamento</b>	<b>Número de pacientes/%</b>
Deficiência mental	83/28
Dismorfias ou doença gênica	143/48
Doença hematológica	5/2
Erros inatos do metabolismo	10/3
Reprodução humana	30/10
Síndromes de predisposição ao câncer	7/2
Transtornos do espectro autista	21/7
<b>Total</b>	<b>299/100</b>

Para investigação destes indivíduos, foram realizados um total de 355 exames genéticos: 222 cariótipos (5 destes com pesquisa de quebras cromossômicas), 47 pesquisas da Síndrome do X-frágil, 9 MLPA e 76 CMA. Em um único caso foi solicitada a pesquisa de mutação pelo método de sequenciamento de nova geração (NGS, *Next-generation Sequencing*), processada em laboratório externo.

Nesta amostra, dos 222 cariótipos realizados, 35 tiveram resultado alterado (Tabela 3). Em outros 7 casos, o resultado normal do cariótipo permitiu confirmar ou excluir o diagnóstico inicial (Tabela 4).

Assim, o cariótipo contribuiu para o diagnóstico em 42 das 222 indicações (18,9%). Em relação aos resultados alterados, a maioria foi devida a alterações no número de cromossomos, como as trissomias dos cromossomos 21 (Síndrome Down) e 18 (Síndrome Edwards), e alterações nos cromossomos sexuais (Síndrome Klinefelter, Síndrome Turner). Excluindo esses casos, o diagnóstico foi possível em sete de 222 exames realizados, ou seja, 3,1% dos casos, concordando com os dados estabelecidos na literatura (MILLER et al., 2010). Note-se também que a maioria das alterações (29/35; 82,8%) foi encontrada em crianças com idade igual ou menor que 3 anos, sendo 16 no primeiro mês de vida, com 13 destes por suspeita da Síndrome Down, sinalizando que quando a síndrome é reconhecida há mais chance de que seja encaminhada para investigação genética.

A pesquisa de quebras cromossômicas no cariótipo foi realizada em cinco indivíduos com alterações hematológicas encaminhados para o Serviço de Genética para afastar Anemia de Fanconi. Essa doença, de herança autossômica recessiva, se caracteriza por citopenias, sangramentos, microssomia, surdez, estrabismo, cardiopatia congênita, malformações renais, aplasia radial e alterações dos polegares, dentre outros achados. Na Anemia de Fanconi, é característico o achado de quebras cromossômicas induzidas por mitomicina C e diepoxibutano, ao cariótipo (OMIM #227650). Como o HUB é o único hospital da rede pública no Distrito Federal, que realiza este tipo de exame, quando existe essa suspeita clínica, habitualmente os pacientes são encaminhados para este Serviço. Neste trabalho, a pesquisa de quebras cromossômicas foi negativa em todos os casos investigados.

O cariótipo também foi solicitado para 26 dos 30 indivíduos encaminhados para investigação na área de Reprodução Humana. Os pacientes tinham indicação de análise cromossômica por aborto recorrente, infertilidade conjugal, e para aconselhamento genético por malformações ou cromossomopatias em uma gestação anterior. Dos quatro indivíduos que não realizaram o cariótipo, 2 foram consultas para aconselhamento de casamento consanguíneo, uma teve o diagnóstico da Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide e um quarto paciente, realizou pesquisa de mutação no gene TSC2 para aconselhamento de Esclerose Tuberosa (realizado em laboratório externo).

Além da suspeita clínica de uma síndrome específica, como no caso da Síndrome Down, outros motivos relativamente frequentes de encaminhamento para investigação genética são o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) e a deficiência intelectual (DI). Nesta amostra, 27,75% dos pacientes foram encaminhados por este motivo. Por sua vez, os pacientes foram divididos em ADNPM/DI sindrômico (associados a malformações congênitas múltiplas) e não sindrômico, com uma frequência nesta população de 79,5% e 20,5%, respectivamente. Na análise foi observado que não constava no prontuário destes pacientes uma avaliação neuropsicológica, pelo que foi considerado ADNPM/DI quando estavam presentes no prontuário os termos déficit intelectual, dificuldades no aprendizado e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Não foi considerado o atraso na fala isolado.

Tabela 3. Resultados dos cariótipos alterados

N	Idade/Sexo	Características clínicas	Resultado do cariótipo	Diagnóstico
1	6d/M	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XY,+21	Síndrome Down
2	7d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	46,XX,+21,der(21;21)q10;q10)	Síndrome Down
3	8d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
4	8d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
5	8d/M	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XY+21	Síndrome Down
6	10d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX+21	Síndrome Down
7	10d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
8	11d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
9	11d/M	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XY,+21	Síndrome Down
10	13d/M	Baixa estatura, microcefalia, dismorfias	47,XY,+21	Síndrome Down
11	27d/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
12	1m/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
13	1m/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
14	2m/M	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XY,+21	Síndrome Down

Continua

**Tabela 3. Resultados dos cariótipos alterados (continuação)**

N	Idade/Sexo	Características clínicas	Resultado do cariótipo	Diagnóstico
15	2m/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
16	1a/F	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
17	2a/M	Características da trissomia do 21	47,XY,16qh+,+21	Síndrome Down
18	2a/F	Características da trissomia do 21	47,XX,+21	Síndrome Down
19	15a	Características da trissomia do cromossomo 21	47,XX,+21	Síndrome Down
20	18d/F	Malformações congênicas múltiplas	47,XX,+18	Síndrome Edwards
21	NC	Mãe de filha com Síndrome Turner	45,X	Síndrome Turner
22	18d/F	Pescoço alado, edema de dorso dos pés, hemangioma em nariz	45,X	Síndrome Turner
23	3m/F	Características da Síndrome Turner	45,X,+mar/45,X	Síndrome Turner
24	1a/F	Implantação baixa de cabelos na nuca, fendas palpebrais oblíquas para baixo, pescoço alado, edema em dorso dos pés	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)	Síndrome Turner
25	3a/F	Baixa estatura	45,X,del(X)(pter-q22)	Síndrome Turner
26	16a/F	Baixa estatura, amenorreia primária	45,X	Síndrome Turner
27	29d/M	Hipogonadismo	47,XXY/46,XY	Síndrome Klinefelter em mosaico
28	NC	Malformações congênicas múltiplas	45,X,der(15)?t(15;X)(p10;q10),-X	Cromossomopatia

Continua



**Tabela 3. Resultados dos cariótipos alterados (conclusão)**

<b>N</b>	<b>Idade/Sexo</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Resultado do cariótipo</b>	<b>Diagnóstico</b>
29	4m/M	Deficiência de crescimento, pequenas dismorfias, CIA, DNPM adequado	47,XY,+mar[17]/46,XY[13]	Cromossomopatia
30	6m/F	Malformações congênitas múltiplas, convulsões	47,XX+del(13)(q)	Cromossomopatia
31	11a/M	DI grave, dismorfias, cardiopatia congênita	47,XY,der(9),t(2;9)(p25;q13)	Cromossomopatia
32	22a/F	Irmã com translocação	45,XX,der (14;21)(q10;q10)	Cromossomopatia
33	35a/M	Infertilidade	46,XY,t(2;13)(2p12;13q11)	Cromossomopatia
34	40a/M	Infertilidade	47,XY,+mar	Cromossomopatia
35	3a/F	Disgenesia gonadal	45,X [19]/46,XY[11]	Disgenesia gonadal

**F, feminino; M, masculino; d, dias; m, meses; a, anos; CIA, comunicação interatrial; DI deficiência intelectual; DNPM, desenvolvimento neuropsicomotor.**

**Tabela 4. Resultados dos cariótipos normais que permitiram exclusão da hipótese diagnóstica**

<b>N</b>	<b>Idade/Sexo</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Resultado do cariótipo</b>	<b>Diagnóstico</b>
1	3d/F	Algumas características clínicas da Trissomia do 21 (9 sinais)	46,XX	Afastada a Síndrome Down
2	7d/M	Dismorfias menores, lactente hígido	46,XY	Dismorfias menores familiares
3	5m/F	Dismorfias menores, sem critérios clínicos da Síndrome Down	46,XX	Afastada a Síndrome Down

Continua

**Tabela 4. Resultados dos cariótipos normais que permitiram exclusão da hipótese diagnóstica (conclusão)**

<b>N</b>	<b>Idade/Sexo</b>	<b>Características clínicas</b>	<b>Resultado do cariótipo</b>	<b>Diagnóstico</b>
4	7a/F	Características da Trissomia do 21	46,XX	Afastada a Síndrome Down
5	11a/ F	Baixa Estatura	46,XX	Afastada a Síndrome Turner
6	12a/F	Características da Síndrome Turner	46,XX	Afastada a Síndrome Turner
7	30a/F	Amenorreia primária, hipogonadismo hipergonadotrófico	46,XX	Disgenesia Gonadal pura XX.

**F, feminino; M, masculino; d, dias; m, meses; a, anos**

A OMS define a DI como uma redução significativa na habilidade de entender informação nova ou complexa e de aprender e aplicar novas habilidades, de início prévio à idade adulta. A definição inclui os casos de transtorno do espectro autista com déficit cognitivo (WHO [2018]).

A incidência do ADNPM/DI é de aproximadamente 3%, e a etiologia é diversa, com 18,6 a 44,5% originados de causa exógena (teratógenos, infecções) e de 17,4 a 47,1% de causa genética (MOESCHLER; SHEVELL, 2006).

Os transtornos do espectro autista (TEA) compreendem um grupo de condições que têm em comum alterações na comunicação e interação social e estereotípias (SCHAEFER; MENDELSON, 2013; MILLER et al., 2010). A incidência do transtorno do espectro autista é de 1:150 indivíduos aproximadamente. No ambulatório de Genética Médica do HUB foi o motivo do encaminhamento de 21 indivíduos entre os 299 avaliados (7%), sendo 5 destes considerados sindrômicos (23,8%) e 16 não sindrômicos (76,2%).

Em 2006 o Comitê de Genética da Academia Americana de Pediatria (AAP) publicou um relatório clínico com o objetivo de orientar aos pediatras quanto à avaliação diagnóstica de crianças com deficiência intelectual ou atraso no desenvolvimento, incluindo as causas genéticas. O relatório recomenda uma

abordagem destes pacientes onde conste a história clínica e familiar e os exames físico, dismorfológico e neurológico. Em um estudo realizado na Holanda o diagnóstico etiológico foi possível em 54% dos pacientes com ADNPM/DI, em um terço dos casos pela história e o exame físico apenas; em outro terço o exame físico orientou o diagnóstico, posteriormente confirmado com exames adicionais; no terço restante, o diagnóstico foi possível com os exames de laboratório, exclusivamente. Outros estudos mostraram resultados similares. Ou seja, aproximadamente a metade dos casos fica sem diagnóstico, e entre aqueles que tiveram uma etiologia definida, em apenas 16% foi possível fazê-lo exclusivamente pela anamnese e o exame físico. Dentre os exames de laboratório, como abordagem genética da ADNPM/DI, a AAP sugere a avaliação citogenética, pesquisa da Síndrome do X-Frágil, pesquisa de rearranjos subteloméricos pelo FISH, investigação metabólica, e exames moleculares (MOESCHLER; SHEVELL, 2006). Cabe destacar, que atualmente, a pesquisa de rearranjos subteloméricos pelo FISH tem sido ultrapassada por outras tecnologias, como o CMA e o sequenciamento de nova geração.

A avaliação genética dos transtornos do espectro autista também tem como processo inicial a anamnese, história familiar e avaliação dismorfológica com o objetivo de identificar síndromes conhecidas que orientem a realização de exames confirmatórios específicos. Quando isso não é possível, outros testes genéticos podem ser realizados: CMA, cariótipo, pesquisa da Síndrome do X-frágil e pesquisa de mutações para síndromes gênicas. Diversos estudos demonstraram que o CMA é superior e apresenta um maior custo-benefício que o cariótipo, sendo indicado como o primeiro exame a ser realizado nos indivíduos com TEA. A análise cromossômica por microarranjos tem um rendimento diagnóstico para o TEA de 10%, enquanto o rendimento do cariótipo é de 3%. A pesquisa de mutações em *FMR1* é positiva em 1-5% dos casos, no *MECP2* (gene associado à Síndrome Rett, no sexo feminino) é 4% e no *PTEN* (Síndrome Cowden, em indivíduos com perímetro cefálico maior a 2,5DP) é de 5% (SCHAEFER; MENDELSON, 2013). Além desses outros genes estão implicados ou têm forte evidência de associação com o TEA, por exemplo, *NRX1*, *SCL6A8*, *POGZ*, *ARID1B* (VORSTMAN et al. 2017).

A Síndrome do X-frágil, é causada pela deficiência ou ausência de FMRP, produto do gene *FMR1*, localizado no braço longo do cromossomo X. Caracteriza-se

por deficiência mental, moderada em homens e leve nas mulheres. Além disso, os homens afetados podem apresentar algumas características físicas: macrocrania, face alongada, fronte e mandíbula proeminentes, frouxidão ligamentar, macroorquidia, e distúrbios do comportamento, incluindo o transtorno do espectro autista (SAUL; TARLETON, 2012). As variantes patogênicas de *FMR1* incluem a expansão do trinucleotídeo CGG na região 5'UT em 99% dos casos. As largas expansões causam hipermetilação e inibição da transcrição. Outro mecanismo pode incluir deleção ou mutações que causem inativação do gene. Normalmente, os alelos contêm de 5 a 44 repetições do trinucleotídeo, de 45 a 54 é considerado inconclusivo; de 55 a 200 pré-mutação e mutação completa com 230 ou mais repetições (MADDALENA et al., 2001). A Síndrome do X-frágil é considerada a causa mais comum de deficiência mental; dados na literatura sugerem que aproximadamente 2% dos pacientes com deficiência mental tem mutações em *FMR1*, tanto homens como mulheres (MOESCHLER; SHEVELL, 2006). Uma revisão sistemática da literatura realizada em 2005 demonstrou que há uma chance maior de se encontrar a mutação em pacientes com deficiência mental severa (4,1%), quando comparados àqueles com graus mais leves (1%) (van KARNEBEEK et al., 2005). A PCR é um método com alta sensibilidade para detectar repetições em número normal ou pré-mutação, mas é menos sensível para repetições maiores. Tradicionalmente, o padrão ouro para o diagnóstico da síndrome do X-frágil era o Southern Blot, associado à PCR. O Southern Blot pode detectar desde alelos normais até a mutação completa, além da metilação na região promotora; mas este método tem um baixo nível de resolução para estimar o número de repetições, e por isso devia ser complementado com a PCR (TASSONE, 2015).

Atualmente, as modificações na técnica da PCR fizeram com que a necessidade do uso do Southern Blot diminuísse. A Portaria GM/MS n° 199/2014 prevê o uso das duas técnicas, PCR e Southern Blot, no entanto no HUB foi realizada apenas a PCR, de acordo com trabalhos mais recentes que afirmam que a PCR é mais rápida e sensível que Southern Blot (MATSUDA, 2017). Cabe lembrar, que técnicas baseadas em PCR e Southern Blot só testam a presença de expansão de CGG. Indivíduos com a Síndrome do X-frágil causada por deleção ou mutação não serão detectados por estes métodos (1% dos casos).

Entre os indivíduos avaliados neste trabalho, 47 de 299 (15,7%) tiveram indicação de pesquisa da Síndrome do X-frágil e destes, dois foram alterados (4%), em concordância com dados da literatura. Diversos trabalhos tentaram provar que fazendo uma pré-seleção clínica dos pacientes que farão o exame, é possível aumentar a chance de diagnóstico até 7,6% (MOESCHLER; SHEVELL, 2006).

Outro método de rastreio para as síndromes com ADNPM/DI, segundo a AAP é a pesquisa de deleções subteloméricas por FISH, porém a MLPA e a CMA podem ser utilizadas também com esta finalidade. Inclusive, esses últimos podem ser considerados exames de primeira linha para a detecção de anomalias cromossômicas constitucionais, principalmente nos países em desenvolvimento nos quais o sequenciamento de nova geração (NGS) ainda tem alto custo (POHOVSKI et al., 2013).

Apesar da ampla utilidade do MLPA, este exame foi solicitado em nove dos 299 indivíduos avaliados (Tabela 5), tendo sido positivo em uma oportunidade de seis resultados disponíveis (16%). Este valor é um pouco mais alto que o reportado em outros trabalhos, que foi de 9,3% (BOGGULA, 2014). Vale ressaltar que o MLPA foi utilizado aqui apenas como método de confirmação diagnóstica e não como método de rastreio, justificando assim, seu uso restrito e, provavelmente, a positividade maior.

Como mencionado previamente, a vantagem do MLPA é que existem kits comerciais com fins diversos, o resultado pode ser obtido de forma relativamente rápida e tem baixo custo. De qualquer forma, é um método dirigido à pesquisa de síndromes e alterações específicas, pelo que se não existe uma hipótese diagnóstica clara, é preferível usar um método de rastreio, como o CMA.

A CMA foi realizada em 76/299 indivíduos, sendo positiva em 17 casos (22%), como consta na Tabela 6. Se desconsiderarmos as variantes de significado desconhecido (6/76, 7,8%), a positividade do teste cai para 14,4%. Estes valores estão de acordo com os descritos na literatura. Em uma revisão sistemática de 33 estudos, incluindo 21.698 pacientes, a média de diagnósticos com este método foi de 12,2% entre todos os trabalhos (MILLER et al., 2010).

Tabela 5. Solicitações e resultado do MLPA

N	Idade/ Sexo	Características clínicas	Hipótese diagnóstica	Kit MLPA/ Resultado
1	NC/F/M	Um filho com S. Wolf e outro com cardiopatia congênita	Síndrome da deleção 22q11.2	Kit para pesquisa de del 22q/ normal para ambos progenitores.
2	18d/F	Pescoço alado, edema de dorso dos pés, hemangioma em nariz	Síndrome Turner	Kit para pesquisa de SRY/ ausência de marcador SRY
3	22d/F	Hipotonia, face inexpressiva	Síndrome Prader-Willi	Kit Síndrome Prader-Willi/Positivo
4	3a/F	Baixa estatura, assimetria corporal, face triangular	Síndrome Silver Russell	Kit Síndrome Silver Russel/normal
5	4a/M	Macrossomia	Síndrome Beckwith-Wiedemann	Kit Síndrome Beckwith-Wiedemann/normal
6	48a/F	Câncer	Câncer familiar	Kit para BRCA1 e BRCA2/ normal (realizado em laboratório externo)

F, feminino; M, masculino; d, dias; m, meses; a, anos; S., síndrome. Em cinza, resultado alterado.

Diferenças nas taxas de diagnósticos entre os diferentes tipos de microarranjos utilizados, também tem sido demonstradas. Um trabalho de 2010 comparou a porcentagem de casos positivos na análise com BACs e com oligonucleotídeos (Tabela 7). Os *arrays* de oligonucleotídeos permitem detectar alterações de até 30kb enquanto os *arrays* de BACs tinham resolução de cerca de 1MB.

**Tabela 6. Resultados alterados do CMA**

N	Idade/Sexo	Características Clínicas	Resultado do Cariótipo	Resultado do CMA
1	3m/F	Fenda palatina e dismorfias	46,XX	arr[hg19] 16p12.2(21,841,353-22,442,007)x3
2	4m/M	Cardiopatia complexa com duas vias de saída de VD, microcefalia	46,XY	arr[hg19] 6p25.3p25.1(156,974-5,608,374)x3 arr[hg19] 20q13.33(61,532,506-62,913,645)x1
3	1a/F	ADNPM	Não realizado	arr[hg19] 5q14.3q15(91,606,979-97,588,983)x3
4	1a/F	Dismorfias faciais, déficit de ganho ponderal, ADNPM	46,XX	arr[hg19] 1q21.1q21.2(145,786,289-147,814,497)x3
5	3a/M	TEA	46,XY	arr[hg19] 18q11.2q12.3(20,779,770-38,077,441) hmz
6	7a/M	ADNPM, dismorfias	46,XY	arr[hg19] 15q11.2q13.3(22,770,421-32,439,281)x4
7	10a/M	DI	46,XX	arr[hg19] 16p11.2(29,580,020-30,190,029)x3

Continua

Tabela 6. Resultados alterados do CMA (continuação)

N	Idade/Sexo	Características clínicas	Resultado do cariótipo	Resultado do CMA
8	10a/M	Ictiose congênita	Não realizado	arr[hg19] Xp22.31(6,455,151-8,141,076)x0
9	11a/M	DI grave, dismorfias	47,XY,der(9),t(2;9)(p25;q13)	arr[hg19] 9p24.3q13(208,454-68,358,120)x3 arr[hg19] 2p25.3p25.1(12,770-8,187,008)x3
10	13a/M	ADNPM	Não realizado	arr[hg19] 16p11.2(32,588,891-33,814,547)x1
11	17a/M	Síndrome de Williams	46,XY	arr[hg19] 7q11.23(72,643,519-74,146,927)x1
12	NC	Dismorfias, DI, polifagia, comportamento esquizoide	46,XX	arr[hg19] 17q23.2q23.3(60,356,809-61,259,018)x1 – VUS arr[hg19] Xq23(112,073,164-112,136,279)x1 - VUS
13	10d/M	DI grave familiar	46,XY,14ps+mat	arr[hg19] Xq28(148,689,939-148,738,888)x0 - VUS
14	2a/M	Microtia, apêndice auricular esquerdo.	46,XYqh-  46,XX	arr[hg19] 8p11.21p11.1(42,793,568-43,824,035)x3 arr[hg19] 18q11.2(20,386,017-20,566,604)x1 – VUS
15	4a/F	ADNP, dismorfias		arr[hg19] 13q12.12(23,519,916-24,936,796)x3 - VUS arr[hg19] 1p31.1(74,950,713-75,678,584)x3 – VUS

Continua



Tabela 6. Resultados alterados do CMA (conclusão)

N	Idade/Sexo	Características clínicas	Resultado do cariótipo	Resultado do CMA
16	6a/F	DI, dismorfias	46,XX	arr[hg19] 2q33.1q36.3(197,717,565-229,843,733) hmz  arr[hg19] 1q23.1(156,801,828-156,855,797)x1 – VUS
17	10a/M	Criptorquidia à esquerda, ADNPM, vitiligo, úvula bífida, perda auditiva	46,XY	arr[hg19] 2q13(111,382,573-113,111,856)x1  arr[hg19] 12p11.21(31,513,788-31,572,227)x1 - VUS

F, feminino; M, masculino; d, dias; m, meses; a, anos; ADNPM, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; DI, deficiência intelectual; TEA, transtorno do espectro autista; VD, ventrículo direito. VUS, variantes de significado desconhecido (em cinza). Observação: para alguns dos pacientes, constam na tabela, os resultados dos progenitores (em segundo lugar).

Tabela 7. Comparação diagnóstica BAC/Oligonucleotídeos

	BAC (>4.600clones)	Oligonucleotídeos (50 oligos por locus clinico)
<b>Anomalias detectadas</b>	17,6%	22,5%
<b>Patogênicas</b>	10,6%	15,4%
<b>VUS</b>	7%	7,1%

Fonte:Neill, 2010 (modificada).

Tal como foi referido anteriormente neste trabalho, nos últimos anos a CMA vem substituindo o cariótipo na investigação genética de pacientes com ADNPM/DI, TEA e malformações congênicas múltiplas. Esta metodologia possui um nível de resolução maior, quando comparado ao cariótipo, e permite detectar alterações de até 50-100kb, dependendo da plataforma de microarranjos utilizada. Outra vantagem da técnica é a possibilidade de detectar regiões de perda de heterozigose, na dissomia uniparental ou consanguinidade, quando realizada em conjunto com uma

plataforma de SNPs. As plataformas de SNP foram originalmente desenhadas para detectar polimorfismos frequentes em estudos de associação genômica ampla (GWAS) de doenças complexas. Assim como na aCGH, as plataformas de SNPs podem detectar perdas e ganhos de regiões genômicas, com a análise do número de cópias. Inclusive, nos últimos anos, os *kits* comerciais têm ampliado a cobertura para melhorar a detecção das CNVs. Como desvantagem, o CMA não detecta rearranjos balanceados ou mosaicismos de baixo grau. Na suspeita dessas alterações, o cariótipo ainda é o método de escolha.

Em 2010 foi publicado um consenso recomendando que a CMA seja o primeiro exame a ser realizado nos casos de ADNPM/DI, TEA e anomalias congênitas múltiplas sem etiologia definida, pois o custo de este exame seria menor que a realização de cariótipo associado a outros exames, como pesquisa de X-frágil e de deleções subteloméricas com FISH, além de ter maior resolução e maior chance de diagnóstico, de aproximadamente 12,2% (*versus* 3% para o cariótipo e 2,5% para o FISH). Por outro lado, quando o paciente tem uma síndrome cromossômica reconhecida, os métodos de citogenética continuam sendo a primeira escolha (MILLER et al., 2010).

Das 17 alterações encontradas, 6 correspondiam a variantes de significado desconhecido (VUS, *Variant of Uncertain Significance*). De um ponto de vista clínico, as CNVs são classificadas em: 1) patogênica ou provavelmente patogênica (síndromes já descritas, variantes novas e variantes de grande tamanho), 2) VUS e 3) provavelmente benigna (não descrita previamente, mas herdada de um dos pais, hígado) (MILLER et al., 2010). As variantes de significado clínico incerto podem ser a causa do quadro clínico, constituir fatores de predisposição ou não terem relação com o quadro clínico, não sendo possível com dados da literatura se distinguir entre essas categorias.

O sequenciamento de nova geração (NGS) é um método que permite o sequenciamento massivo de muitos genes ao mesmo tempo. Como o sequenciamento de Sanger é considerado o primeiro método de sequenciamento, os que lhe seguiram começaram a ser chamados “de nova geração” (TIPU;SHABBIR, 2015). O NGS começou a ser desenvolvido a partir do descobrimento de uma nova técnica, que utilizava a luminescência para medir a síntese de pirofosfato. Esta nova

forma de sequenciamento tinha as vantagens de usar os nucleotídeos naturais (em vez de modificados, como no método de Sanger) e poder ser observada em tempo real. Várias melhoras foram sendo acrescentadas à técnica e, desde 2005, diferentes sequenciadores de nova geração têm sido lançados no mercado. O NGS tem um alto nível de resolução (1bp) e pode detectar desde variantes de um único nucleotídeo (SNVs, *Single Nucleotide Variants*), pequenas inserções e deleções (indels) e CNVs, embora a validade analítica na detecção de CNVs ainda é objeto de estudo (HEATHER; CHAIN, 2015). Nos últimos anos, o sequenciamento de nova geração (NGS) tem começado a ser utilizado também na detecção de CNVs em substituição ao CMA.

Atualmente existem diferentes formas de utilização do NGS no diagnóstico clínico, tais como a pesquisa de mutação em um único gene em casos onde as variantes já foram previamente genotipadas, sequenciamento de painel de genes associados a uma doença específica, sequenciamento de todos os éxons conhecidos até o momento associados a doenças mendelianas (Mendelioma ou exoma clínico), sequenciamento completo do exoma (WES, *Whole-exome Sequencing*) ou do genoma (WGS, *Whole-genome Sequencing*). A técnica tem como vantagens diminuir a necessidade de métodos de diagnóstico invasivo, como biopsia muscular e punção lombar, e acelerar o processo diagnóstico. Isto é especialmente importante no auxílio diagnóstico de doenças que podem pôr em risco a vida do paciente ou que necessitam de uma terapêutica específica, como nos erros inatos do metabolismo. De forma geral, o NGS consegue identificar a etiologia em 40% dos casos sem diagnóstico na faixa etária pediátrica. Desvantagens do NGS são que, além de ser um método caro no Brasil, ainda existe a dificuldade de interpretação de achados incidentais, principalmente seu efeito no quadro clínico e no diagnóstico, e a falta de conhecimento sobre o significado de variantes. Esta incerteza, leva à necessidade de conhecer o perfil genético da população e de compartilhar a informação entre os diferentes centros que utilizam esta tecnologia (WRIGHT; FITZPATRICK; FIRTH, 2018).

Embora amplamente utilizado na prática clínica e em pesquisas no mundo, o NGS não foi contemplado entre os exames previstos na Portaria GM/MS nº 199/2014.

Sem a realização de exames genéticos complementares, o diagnóstico clínico e o aconselhamento genético foi possível em 53/299 pacientes ou 17,7% dos casos. A maioria destes diagnósticos corresponde a crianças híidas ou com distorrias menores familiares, ou doenças gênicas com critérios de diagnóstico clínico bem estabelecido como, por exemplo, Síndrome Marfan, Neurofibromatose tipo 1, Síndrome Ehlers-Danlos, Osteogênese Imperfeita, Síndrome Goldenhar e Esclerose Tuberosa. Nestes casos, embora seja possível o diagnóstico clínico, para muitas síndromes ainda é necessária a pesquisa molecular visando estabelecer a gravidade, o prognóstico e o aconselhamento genético. Além desses, outros pacientes do Serviço de Genética Médica do HUB que se beneficiariam com o uso de NGS, são os que consultaram por síndromes de predisposição ao câncer (2%) e erros inatos do metabolismo (3%).

Em 183 dos 299 (61,2%) indivíduos avaliados não foi possível chegar a um diagnóstico etiológico que explicasse o motivo do quadro clínico. Em 139 (75,9%) daqueles, os pacientes tinham realizado um ou mais de um dos exames genéticos. Nos outros casos, 44 (24%) nenhum exame genético tinha sido realizado (neste grupo se encontram os pacientes que tinham sido encaminhados por suspeita de erro inato do metabolismo, quase todos os que tinham sido encaminhados por síndrome de predisposição ao câncer e os que perderam seguimento sem ter realizado nenhum exame).

Para finalizar, os resultados obtidos da análise dos dados dos pacientes atendidos no Serviço de Genética Médica do HUB, estiveram de acordo com os da literatura, como já foi previamente demonstrado (Tabela 8). A aplicação da tecnologia disponível no HUB teve o mesmo rendimento diagnóstico que em outros países do mundo, inclusive com maior acesso e disponibilidade de recursos.

A Portaria GM/MS nº 199/2014, garante à população brasileira a realização de exames de diagnóstico em genética, porém, a demora na publicação desta Portaria, levou a que uma defasagem em relação à disponibilidade de exames, não contemplando métodos mais modernos, como sequenciamento de nova geração. Inclusive, este último vem sendo utilizado no mundo todo há alguns anos, aumentando a possibilidade de diagnóstico em 40%. Esta metodologia seria especialmente importante para os pacientes que consultaram no Serviço por suspeita de síndromes dismórficas de origem gênica (por exemplo, displasias

esqueléticas, rasopatias) e erros inatos do metabolismo, para os quais o diagnóstico etiológico rápido pode orientar o tratamento mais adequado, com diminuição da morbi-mortalidade e sequelas.

**Tabela 8. Contribuição dos diferentes métodos diagnósticos**

	<b>Este trabalho</b>	<b>Literatura</b>
<b>Cariótipo</b>	3,1%	3%
<b>Pesquisa <i>FMR1</i></b>	4%	4,1% <sup>a</sup>
<b>MLPA</b>	16%	9,3%
<b>CMA</b>		
<b>Variantes patogênicas</b>	14,4%	12,2% <sup>b</sup>
<b>VUS</b>	7,8%	7,1% <sup>b</sup>

a) Em pacientes com deficiência mental severa, b) utilizando *arrays* de oligonucleotídeos.

## 6. CONCLUSÃO

Foram analisados 299 prontuários de pacientes atendidos no Serviço de Genética Médica do HUB. Para investigação destes indivíduos, foram realizados um total de 355 exames genéticos: 222 cariótipos (5 destes com pesquisa de quebras cromossômicas), 47 pesquisas da Síndrome do X-frágil, 9 MLPA, 76 CMA, 1 NGS (externo). Dos 299 pacientes, 61,2% ficaram sem diagnóstico, 17,7% tiveram diagnóstico clínico, 14% por cariótipo, 5,7% por CMA, 0,66% por PCR para pesquisa da Síndrome do X-frágil, 0,33% por MLPA e 0,33% por NGS.

A contribuição da avaliação clínica e dos exames genéticos disponíveis para investigação das doenças genéticas no contexto clínico teve resultados concordantes com os da literatura. Em 17,7% dos casos foi possível realizar o diagnóstico clínico ou aconselhamento genético sem a utilização de exames genéticos complementares. Embora o diagnóstico seja facilitado para algumas síndromes com critérios clínicos bem definidos, a realização de outros exames não contemplados na Portaria, como o sequenciamento de nova geração, seria custo-efetivo em termos de maior rapidez no diagnóstico e início de tratamento mais precoce, quando disponível. O cariótipo teve uma contribuição para o diagnóstico de 3,1%, excluindo da análise os casos de síndromes cromossômicas bem reconhecidas e as alterações nos cromossomos sexuais. A pesquisa de mutações em *FMR1* para diagnóstico da Síndrome do X-frágil foi positiva em 4% dos casos. Para o MLPA, o rendimento diagnóstico foi de 16% e para o CMA de 14,4%, excluindo as variantes de significado desconhecido. Nestes últimos dois, a contribuição para o diagnóstico foi um pouco maior que o previsto na literatura, de 9,3 e 12,2%, respectivamente. Esta diferença provavelmente se deve à maior e melhor seleção dos casos encaminhados para análise. Se considerarmos a contribuição em conjunto dos exames previstos na Portaria e oferecidos pelo SUS (cariótipo, MLPA, PCR para pesquisa da Síndrome do X-frágil e CMA), houve uma melhora do diagnóstico, quando comparado à avaliação clínica exclusiva, 20,7 e 17,7%, respectivamente. Em 61,2% dos casos não foi possível realizar o diagnóstico etiológico, embora 75,9% desses pacientes tenha realizado algum exame genético. Contudo, vários pacientes não completaram a investigação por falta de comparecimento às consultas ou à coleta de exames, o que constitui uma limitação deste trabalho.

A maioria dos pacientes atendidos no Serviço de Genética Médica do HUB corresponde à faixa etária pediátrica e foram encaminhados principalmente por síndromes que cursam com dismorfias, ADNPM/DI e TEA. Os exames previstos na Portaria GM/MS nº 199/2014 atendem esta população, porém contempla apenas um método de avaliação do genoma completo em um único exame, o aCGH, sem contar o cariótipo, que já era contemplado pelo SUS. Os outros exames previstos na Portaria são locus específicos, pelo que uma suspeita diagnóstica forte é importante para aumentar a chance de diagnóstico. Isso nem sempre é fácil, principalmente na área pediátrica, pelo que seria interessante que outros métodos de avaliação de todo o genoma sejam incluídos.

Em definitiva, este é o primeiro e único estudo realizado na região, que permitiu conhecer o perfil epidemiológico dos pacientes encaminhados para avaliação pelo Serviço de Genética Médica do HUB, quantificar e estabelecer o rendimento diagnóstico dos exames genéticos realizados no Laboratório de Genética Clínica da UnB previstos no Portaria GM/MS nº 199/2014 e disponíveis pelo SUS. Um dos limitantes do trabalho foi o número de pacientes que perdeu seguimento e não concluiu a investigação diagnóstica, contudo, naqueles que concluíram a pesquisa, o rendimento diagnóstico foi concordante com os dados publicados na literatura disponível. Com a informação resultante, será possível colaborar com a definição de prioridades na área, selecionar entre as possíveis intervenções, avaliar os recursos requeridos, educar e treinar profissionais e, finalmente, atuar na área de prevenção das doenças raras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT genetic disorders. **Genetics Disorders UK**. Disponível em: <<http://www.geneticdisordersuk.org/aboutgeneticdisorders>>. Acesso em: 2 de maio 2018.

ALWAN, A.; MODELL, B. Recommendations for introducing genetics services in developing countries. **Nat Rev Genet**, 4(1):61-8, Jan. 2003.

BEIGUELMAN B. **Citogenética humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

BOGGULA V.R. et al. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification techniques in identification of aetiology of unexplained mental retardation: a study in 203 Indian patients. **Indian J Med Res**, 139(1)66-75, Jan. 2014.

BRADY P.D.; VERMEESCH J.R. Genomic microarrays: a technology overview. **Prenat Diagn**, 32: 336-343, Apr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde (2014). **Política Nacional de atenção integral às Pessoas com Doenças Raras, Portaria GM/MS nº 199/2014**. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt019930012014.html>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

\_\_\_\_\_-**Alterações da Política Nacional de atenção integral às Pessoas com Doenças Raras, Portaria GM/MS nº 981/2014**. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt098121052014.html>> Acesso em: 28 fev. 2017.

\_\_\_\_\_-**Incorporação de avaliação diagnostic procedimentos laboratoriais e aconselhamento genético para doenças raras. Portaria GM/MS nº5 de 30 de janeiro de 2014**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2014/prt0005\\_30\\_01\\_2014.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2014/prt0005_30_01_2014.html)>. Acesso em 28 de abr. 2018.



\_\_\_\_\_-**Política Nacional de atenção integral em genética clínica, Portaria GM/MS nº 81.** Disponível em:

<<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2009/GM/GM-81.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

BRYCE, J.; VICTORA C.G.; BLACK R.E. The unfinished agenda in child survival. **Lancet**, 382:1049-59, Sep. 2013

EBSERH. HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS. Dados de Atendimento de 2013 e 2014. **Ministério da Educação.** Disponível em: <<http://www.ebserh.gov.br/web/hub-unb/dados-de-atendimento>>. Acesso em 27 jun. 2018.

EIJK-VAN OS P.G; SCHOUTEN J.P. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA ®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. **Methods Mol Biol**, 688:97-126, 2011.

ELKINS KM. Primer design for PCR reactions in forensic biology. **Methods Mol Biol**, 1275:17:30, 2015.

GALRÃO A.L. **Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores sólidos de tireóide.** Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5135/tde-06032012-140621/pt-br.php>> Acesso em: 26 de abr. 2018.

McKINLAY GARDNER R.J.; SUTHERLAND G.R.; SHAFFER L.G. **Chromosome abnormalities and genetic counseling.** 4.ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2012.

GLENN G.; ANDREOU L. Analysis of DNA by Southern Blotting. **Methods in enzymology**, volume 529. Nova Iorque: Elsevier Inc, 2013.

HAAS D.J.; TORRES A.C. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária.** Ano XIV Número 26, 2016.

HEATHER J.M.; CHAIN B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**,107(1):1-8, Jan. 2016.

HERMAN J.G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci**, 93:9821-9826, Sep. 1996.

HOROVITZ, D.D. et al. Genetics services and testing in Brazil. **J Community Genet**, 4 (3): 355-375, Jul. 2013.

INTERFARMA. Doenças raras: contribuições para uma política nacional. **Edições especiais saúde volume V**. São Paulo, Mar. 2013.

LILGLOU T; NIKOLAIDIS G. Quantitative Methylation Specific PCR (qMSP). **Bio-protocol**, 3 (16), 2013. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e871>>. Acesso em: 28 abr. 2018.

MADDALENA A. Technical standards and guidelines for Fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics. **Genet Med**, 3(3)200-5, May-Jun. 2001.

MARQUES-DE-FARIA, A.P. et al. Clinical genetics in developing countries: the case of Brazil. **Community Genet**, 7:95-105, 2004.

MATSUDA K. Single-Nucleotide Polymorphism or mutation: Real-Time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. **Advances in clinical chemistry**. Nova Iorque: Elsevier Inc., 2017.

McGOVERN RA. The use of genetic sequencing technologies to determine HIV-1 viral tropism and to evaluate the effects of Maraviroc on patient viral populations. Tese (Doutor em Filosofia). Faculdade de Graduação e Estudos de Pós-doutorado (Medicina Experimental), University of British Columbia. Vancouver, 2015. Disponível em <<https://www.researchgate.net/publication/303565848>>. Acesso em 29 abr 2018.

MILLER D.T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum. Genet**, 86:749-764, May 2010.

MOESCHLER J.B.; SHEVELL. M.S. Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. **Pediatrics**, 117(6):2304-2316, Jun 2006.

O'CONNOR C. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). **Nature Education**, 1(1):171;2008.

OMIM #227650. Disponível em:

<<https://www.omim.org/entry/227650?search=anemia%20de%20fanconi&highlight=anemia%20de%20anaemia%20fanconi>>. Acesso em: 2 maio 2018.

POHOVSKI L.M. et al., Multiplex-ligation dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. **Mol Cytogenet**, 6(1):7, Feb. 2013.

PREVALENCE statistics for types of genetic disease. **Right Diagnosis**.. Disponível em: <<http://www.rightdiagnosis.com/g/genetic/prevalence-types.htm>> . Acesso em: 2 maio 2018.

RIMOIN, D.L.; PYERITZ, R.E.; KORF, B.R. **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics**. 6 ed. Nova Iorque: Elsevier, 2013.

SAUL R.A.; TARLETON J.C. FMR1-Related disorders. **GeneReviews**. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/>>. Acesso em: 2 maio 2018.

SCHAEFER G.B.; MENDELSON N.J. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. **Genet Med**, 15(5):339-407, May 2013.

SOLINAS-TOLDO et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. **Genes, chromosomes & cancer**, 20: 399-407, Dec. 1997.

SOUSA A.M.; SÁ N.M. Análise das características e dos preceitos normativos da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. **Cad Ibero-Amer Dir Sanit**, v4,n2: 47-67, abr/jun. 2015.

SOUTHERN E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, 98:503-517, Nov. 1975.

TASSONE F. Advanced technologies for the molecular diagnosis of fragil X syndrome. **Expert Rev Mol Diagn**, 15(11):1465-1473, Oct. 2015.

TIPU H.N.; SHABBIR A. Evolution of DNA sequencing. **J Coll Physicians Surg Pk**, 25(3):210-5, Mar. 2015.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Committing to Child Survival: A Promise Renewed. Progress Report 2013**. New York: UNICEF, 2013.

VAN KARNEBEEK C.D. et al. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. **Eur J Hum Genet**, 13:6-25, jan. 2005.

VIEIRA, T.A. **Genética Comunitária: a inserção da genética médica na atenção primária à saúde em Porto Alegre. 2012**. 105f. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

VISSERS L.E. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. **Am J Hum Genet**, 73:1261-1270, Dec. 2003.

VORSTMAN J.A. et al. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. **Nat Rev Genet**, 18(6):362-376, Jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition: intellectual disability** [2018]. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/news/news/2010/15/childrens-right-to-family-life/definition-intellectual-disability>>. Acesso em: 2 maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION MEETING REPORT. **Primary Health Care Approaches for the Prevention and Control of Congenital and Genetic Disorders** - WHO/HGN/WG/00.1. Geneva: WHO, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION ADVISORY COMMITTEE ON HEALTH RESEARCH. **Genomics and World Health**. Geneva: WHO, 2002.

WRIGHT, C.F.; FITZPATRICK, D.R.; FIRTH, H.V. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. **Nat Rev Genet**, 19(5):253-268, May 2018.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### **Termo de consentimento livre e esclarecido**

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância.

Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8 mL de sangue de uma das veias do antebraço para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto, será realizado por pessoa qualificada.

Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância do paciente em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB.

Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_ residente e domiciliado na rua \_\_\_\_\_, portador da Cédula de Identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_ nascido(a) em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo "Investigação da etiologia do retardo mental sindrômico", e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009

---

Assinatura do participante

---

Dra. Íris Ferrari

Pesquisadora responsável

Telefone para contato: (61) 3307 2505

### **Declaração de Responsabilidade**

Declaro que na pesquisa intitulada “Caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais em pacientes com retardo mental e malformações congênitas múltiplas”, sob minha responsabilidade, a coleta de dados somente será iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FM/UnB, estando ainda o seu início condicionado à aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) caso se trate de projeto de Área Temática Especial, Grupo I.

Brasília, 21 de agosto de 2009.

---

Dra. Íris Ferrari

Responsável pela pesquisa

---

Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Colaboradora



## ANEXO II

  
 UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
 FACULDADE DE MEDICINA  
 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

---

## ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de Projeto:** CEP-FM 081/2009.

**Título:** "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

**Pesquisador Responsável:** Iris Ferrari.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 28/10/2009.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 25/11/2009.

## PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.

  
 Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
 Faculdade de Medicina-UNB