



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Marina Cristine Cano Francisquetti

**Caracterização e Necessidades de Saúde de Indivíduos com
Anomalias Orofaciais**

São José do Rio Preto
2019

Marina Cristine Cano Francisquetti

**Caracterização e Necessidades de Saúde de Indivíduos com
Anomalias Orofaciais**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 131906/2017-8

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

São José do Rio Preto
2019

Francisquetti, Marina Cristine Cano.

Caracterização e necessidades de saúde de indivíduos com anomalias orofaciais / Marina Cristine Cano Francisquetti. -- São José do Rio Preto, 2019

93 f. : il., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte

Coorientador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Genética humana. 2. Boca - Anomalias - Aspectos genéticos.
3. Fenda labial. 4. Fissura palatina. 5. Anormalidades craniofaciais.
6. Acesso aos serviços de saúde. I. Título.

CDU – 575.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Marina Cristine Cano Francisquetti

**Caracterização e Necessidades de Saúde de Indivíduos com
Anomalias Orofaciais**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 131906/2017-8

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte
FAMERP/FUNFARME – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Lilian Beani
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
14 de fevereiro de 2019

Aos meus pais Beatriz e Mauricio Francisquetti, pela dedicação,
amor, compreensão e exemplos de determinação e à minha irmã
Marielle Francisquetti (*in memoriam*), eterno amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado por meio da minha fé e não ter me deixado desistir diante das dificuldades.

Aos meus pais, Beatriz Francisquetti e Mauricio Francisquetti, meus grandes exemplos e amores, pelo apoio, pela constante presença em todos os momentos da minha vida e da minha caminhada acadêmica, pelos incentivos, oportunidades que me concederam para realizar mais essa conquista e por terem acreditado em mim. Grata pelo amor incondicional!

À minha irmã, Marielle Francisquetti (*in memoriam*), pelo lindo e eterno legado de aprendizagem, amor, alegria, força e superação. Minha querida irmã, meu eterno amor, minha eterna amiga e confidente, obrigada por toda a cumplicidade que sempre tivemos, por toda ajuda, por todo amor e sorrisos compartilhados.

Ao Lucas Oliveira, pelo carinho, atenção, palavras de incentivo, companheirismo, pela confiança, por me ouvir sempre e por toda a disposição em me ajudar. Obrigada por tanto amor, sempre recíproco!

À minha orientadora, Dra. Agnes Cristina Fett-Conte, pela paciência, confiança, dedicação e oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Obrigada pelas oportunidades vivenciadas, por todos os ensinamentos, por todo apoio, amizade e compreensão diante das dificuldades. Foi uma honra tê-la como orientadora, meu grande exemplo de profissional.

À minha co-orientadora, Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, exemplo de competência, sempre presente e disposta a ajudar e contribuir com o desenvolvimento do trabalho, pela compreensão, oportunidades de aprendizagem no laboratório e na prática clínica.

A toda equipe do Projeto Crânio-Face Brasil pela acolhida, aprendizado e compartilhamento de experiências. Fazer parte deste grupo, que prima pelo profissionalismo e respeito mútuo entre os profissionais de diversas áreas, foi uma enorme honra, satisfação e alegria.

A todas as profissionais e amigas do Laboratório de Genética do HB/Funfarme: Andréa Salles, Brasilina Maffei, Cristina Benitez, Paula Abdalla, Valéria Ferrarese, Carla Thaís Ciência e Adriana Gonçalves, muito obrigada por todo o carinho, incentivo, compreensão e ensinamentos, fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, Fernanda Monteiro e Dante Rosan, pela paciência, ensinamentos e companheirismo.

A todos meus amigos queridos, pelos momentos inesquecíveis, pelas vivências compartilhadas e pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, sua coordenadora Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos e a todos os professores que colaboraram com a minha formação acadêmica.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, seus representantes e docentes, pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

A Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e ao Hospital de Base, pela disponibilidade da infraestrutura laboratorial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições científicas.

A todos os pacientes que aceitaram participar deste projeto, o meu enorme respeito, minha eterna gratidão pela resignação, paciência e confiança.

*“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem
de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos”.*

Paulo Coelho

RESUMO

As fendas ou fissuras orofaciais típicas (FOT) são consideradas defeitos congênitos comuns na população. Apresentam etiologia complexa e podem ocorrer isoladamente ou como componentes de síndromes, como a síndrome de Deleção 22q11.2, a mais frequentemente associada com FOT. A investigação dos fatores genéticos, epidemiológicos e das necessidades de saúde dos afetados é fundamental para o esclarecimento do diagnóstico etiológico, prognóstico, fatores de risco, planejamento terapêutico, Aconselhamento Genético, estabelecimento de estratégias de acesso à saúde e de prevenção. Entretanto, pouco se conhece dos afetados por FOT na realidade brasileira. Este estudo de coorte retrospectivo e descritivo teve como objetivo estudar aspectos clínicos e epidemiológicos, fatores de risco e acesso a tratamentos de pacientes com FOT. Foi realizada coleta de dados e avaliação de 70 indivíduos, síndrômicos e não-síndrômicos, com a utilização de um protocolo uniformizado da Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais (BBAC/CranFlow[®]), do Projeto Crânio-Face Brasil (BBAC/CranFlow[®]/SJRP). Os dados em investigação foram extraídos diretamente desta Base. Foram avaliados dados de pacientes de São José do Rio Preto inseridos de 2014 a 2016 e casos novos, inseridos de 2017 a 2018, que foram registrados por meio de entrevistas, exames e avaliações multidisciplinares. Exames genéticos laboratoriais foram realizados a critério clínico, específico para cada caso. A maioria dos indivíduos eram síndrômicos (68,57%), de ascendência nativa, classe social baixa e sem recorrência familiar. Todos os tipos de fendas foram mais comuns nos homens. Houve diferença significativa entre os sexos quanto ao tipo de FOT. Foram identificados fatores etiológicos em 54,16% dos casos síndrômicos e não houve diferença significativa com relação aos fatores de risco entre síndrômicos e não-síndrômicos. Houve atraso no diagnóstico das fendas e no acesso aos tratamentos na maioria dos casos. A maioria dos resultados corroborou dados previamente descritos. Uma base de dados parece ser uma estratégia útil para identificar características importantes relacionadas às FOT. Os resultados podem contribuir para planejamento de políticas públicas objetivando a superação de iniquidades e melhoria da qualidade de vida dos afetados e de seus familiares.

Palavras-chave: acesso à saúde, fenda labial, fenda palatina, microdeleção, defeito congênito.

ABSTRACT

Typical orofacial clefts (TOC) are considered common congenital defects in the population. They present complex etiology and may occur in isolation or as components of syndromes, such as 22q11.2 deletion syndrome, most frequently associated with TOC. The investigation of the genetic, epidemiological factors and health needs of the affected is fundamental for the clarifying of the aetiological diagnosis, prognosis, risk factors, therapeutic planning, Genetic Counseling, establishment of strategies of access to health and prevention. However, little is known of those affected by TOC in the Brazilian reality. This retrospective and descriptive cohort study aimed to study the epidemiological and clinical aspects, the risk factors and access to treatment from Brazilian patients with TOC. Was realized a data collection and evaluation of 70 individuals, syndromic and non-syndromic, using a standardized protocol, of the Brazilian Database of Anomalies Craniofacial (BDAC/CranFlow[®]), of the Brazil's Craniofacial Project (BDAC/CranFlow[®]/SJRP). The data under investigation were extracted directly from this Database. We evaluated data from patients from São José do Rio Preto inserted from 2014 to 2016 and new cases, from 2017 to 2018, which were recorded through interviews, examinations and multidisciplinary evaluations. Genetic laboratory tests were performed according to clinical criteria, specific to each case. Most individuals were syndromic (68.57%), of native ancestry, from lower middle class, who presented no familial recurrence. All the types of TOC contributed to a higher affection rate among males. There was a significant difference in the types of TOC concerning sex. We identified etiological factors in 54.16% of syndromic cases and there was no significant difference regarding the risk factors of syndromic and nonsyndromic individuals. There was a delay in diagnosis time and in the access to treatments in most of cases. Most of our results corroborated to others previously described in the literature. A database seems to be a useful strategy to identify important characteristics related to TOC. The results can contribute to the planning of public policies aimed at overcoming inequities and improving the quality of life of those affected and their families.

Key words: health access, cleft lip, cleft palate, microdeletion, birth defects.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático do desenvolvimento do lábio e do palato em humanos. 16
- Figura 2.** Desenho ilustrativo dos tipos de fendas. 16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Centros de referência habilitados e credenciados para atendimento de indivíduos com fendas labiopalatais e data do credenciamento.....	19
Tabela 2. Tipos de tratamentos para fendas orais, com base nas recomendações do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/Centrinho/USP).....	21
Tabela 3. Critérios para indicação de triagem para a SD22q11.2.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

a-CGH	<i>Array-Comparative Genomic Hybridization</i>
BBAC	Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais
BDCA	<i>Brazilian Database of Craniofacial Anomalies</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID 10	Classificação Internacional de Doenças
CLAP	Centro de Reabilitação de Fissuras Labiopalatais
CNVs	<i>Copy Number Variations</i>
CranFlow	<i>Craniofacial Anomalies: Registration, Flow, and Management</i>
DCs	Defeitos Congênitos
Del	Deleção
DMs	Defeitos Múltiplos
Dup	Duplicação
FL	Fissura/fenda Labial
FLP	Fissura/fenda Labiopalatal
FL/P	Fissura/fenda Labial com ou sem Fissura/fenda Palatal
FOT	Fissuras/fendas Orais Típicas
FP	Fissura/fenda Palatal
FUNCRAF	Fundação para o Estudo e Tratamento das Deformidades Crânio-Faciais
HB	Hospital de Base
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCFB	Projeto Crânio-Face Brasil
SD22q11.2	Síndrome da Deleção 22q11.2
SINASC	Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos
SM	Salário Mínimo
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Fendas orofaciais: aspectos gerais	15
1.2. Atendimento de pacientes com FOT no Brasil.....	18
1.3. Projeto Crânio-Face Brasil e Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais	20
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Casuística	26
3.2. Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais	28
3.3. Investigação das características epidemiológicas e histórico gestacional	28
3.4. Investigação de fatores etiológicos	28
3.5. Aspectos vinculados ao acesso e necessidade de tratamentos	29
3.6. Análise laboratorial.....	29
3.7. Análise estatística	31
3.8. Considerações éticas	31
4. RESULTADOS	34
Capítulo I.....	35
Capítulo II	61
Capítulo III	73
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fendas orofaciais: aspectos gerais

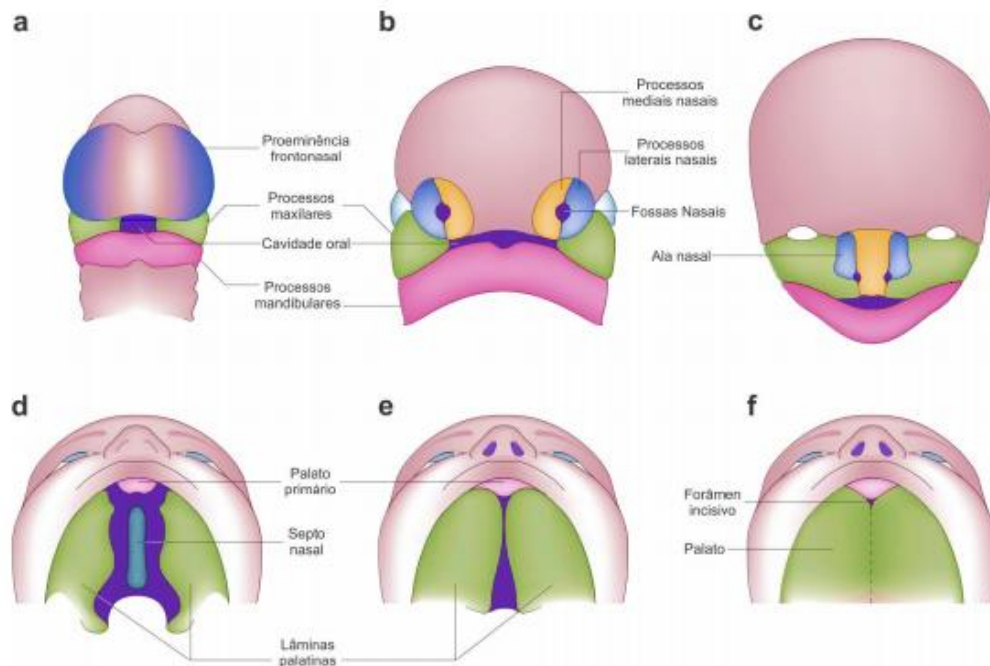
As fendas (fissuras) orais típicas (FOT) são defeitos congênitos (DCs) da face e região oral comuns na população. Afetam um recém-nascido a cada 2,5 minutos no mundo, com uma incidência estimada em 1:700 (ABULEZZ, 2017). No Brasil, a prevalência varia de 0,36 e 1,54:1000 nascidos vivos dependendo da região geográfica. Populações asiáticas e indígenas americanos apresentam a maior prevalência, de 2,1:1000 e 3,6:1.000, respectivamente. Nos europeus observa-se 1,3:1.000 e em populações africanas e suas derivadas a prevalência é de 0,3:1.000 (MARTELLI et al., 2015). Na América Latina, a prevalência é de 0,87 por 1.000 nascimentos e as FOT respondem por 10-25% das admissões hospitalares pediátricas, ocupando entre o 3º e o 4º lugares entre as causas de óbito no primeiro ano de vida (CUNHA et al., 2004; BRASIL, 2018 – Ministério da Saúde). Essas observações sugerem que há uma contribuição relativa dos genes de susceptibilidade individual e que podem variar em populações diferentes. A incidência varia amplamente dependendo da origem geográfica, grupo racial e étnico, exposições ambientais e status socioeconômico (GATTI et al., 2017). Além disso, em alguns casos, a prevalência pode estar subestimada por ausência de notificação dos serviços de saúde, falta de diagnóstico e, até mesmo, classificações errôneas (SOUZA, RASKIN, 2013).

As FOT ocorrem como consequência de uma falha na fusão do processo frontonasal com o maxilar durante o desenvolvimento gestacional (Figura 1). A fenda labial ocorre por falha na fusão dos processos medial nasal e maxilar durante a 6ª-7ª semana de gestação, e a fenda palatal por falha ou interrupção na fusão dos palatos na 12ª semana (GALLAGHER et al., 2018).

São observadas como um defeito isolado ou como componente de quadros sindrômicos (LESLIE & MARAZITA, 2013; BILIŃSKA, OSMOLA, 2015). De modo geral, os casos de fenda palatal (FP) são mais associados a outros DCs do que os casos de fenda labial (FL) e labiopalatal (FLP) (Figura 2). Aproximadamente 70% de todos os casos (FL/P) e 50% dos casos de FP são considerados não-sindrômicos; enquanto o restante corresponde a casos sindrômicos, de etiologia cromossômica, gênica ou teratogênica (DIXON et al., 2011; MARAZITA, 2012).

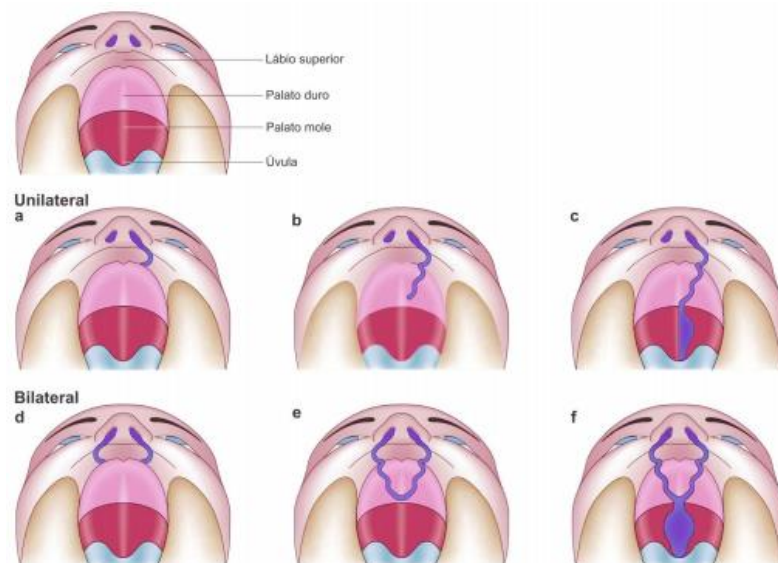
A etiologia é desconhecida na maior parte dos casos, mas considera-se herança multifatorial, com possível influência de agentes teratogênicos ambientais em efeito aditivo a fatores genéticos e epigenéticos (GALLAGHER et al., 2018).

Figura 1. Desenho esquemático do desenvolvimento do lábio e do palato em humanos.



Legenda: a) Ao redor da 4ª semana do desenvolvimento embrionário ocorre o desenvolvimento da proeminência frontonasal (observada em azul), dos processos maxilares (verde), processos mandibulares pareados (rosa), e a cavidade oral primitiva ao centro (roxo); b) Ao redor da 5ª semana, as fossas nasais são formadas (roxo), o que leva à formação dos processos nasais pareados mediais (amarelo) e laterais (azul); c) Ao fim da 6ª semana os processos mediais nasais se fundem com os processos maxilares para a formação do lábio superior e o palato primário. Os processos laterais nasais formam a ala nasal (amarelo). De forma similar, os processos mandibulares se fundem para formar a maxila inferior (rosa); d) Durante a 6ª semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve com o crescimento bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente ao lado da língua (verde); e) Em sequência as lâminas palatinas se elevam a uma posição horizontal sobre a língua, entrando em contato uma com a outra e começando a fusão; f) Por fim, temos a fusão das lâminas palatinas, dividindo o espaço oronasal em cavidades oral e nasal separadas. **Fonte:** Adaptada de DIXON et al., 2011.

Figura 2. Desenho ilustrativo dos tipos de fendas.



Legenda: Fenda unilateral (a) e bilateral (e) do palato mole; fendas labiopalatais unilaterais (b e c); fendas labiais (d) e palatais bilaterais (f). As fendas estão indicadas em roxo. **Fonte:** Adaptada de Dixon et al., 2011.

Inúmeros fatores ambientais já foram sugeridos como contribuintes para a gênese da FL e/ou FP, como a exposição intrauterina a anticonvulsivantes, ácido retinóico, álcool, tabaco, deficiências de vitaminas e diabetes materno. Por outro lado, a suplementação por ácido fólico, sozinho ou em associação com vitaminas, durante o início da gravidez é relatada como um fator de proteção para o desenvolvimento de defeitos de tubo neural (GATTI et al., 2017; SILVA et al., 2018). Histórico familiar também é um importante fator associado a FOT; recorrência familiar é muito comum entre os pacientes com FOT e seus parentes apresentam um maior risco se comparado ao da população em geral (SILVA et al., 2018). Os fatores ambientais são responsáveis por 70 a 80% dos casos, enquanto o componente genético é considerado o fator causal principal em 25 a 30% (RODRIGUES et al., 2009).

As FOT não são apenas uma distorção estética da aparência facial, mas também podem interferir e influenciar negativamente as atividades normais da criança, especialmente alimentação, audição e fala, e predispor a infecções, além de crescimento anormal facial e possíveis desordens psicológicas (ABULEZZ, 2017; SILVA et al., 2018). A variedade das condições clínicas em FOT, somada aos diferentes graus de gravidade e possível associação com quadros sindrômicos ou outros DCs, resulta em protocolos terapêuticos específicos e requer atuação de equipe multidisciplinar de profissionais da saúde (SOUSA; RONCALLI, 2017).

Inúmeras síndromes estão associadas à ocorrência de FOT. Entretanto, a Síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) é a mais frequentemente associada com FP. Também é conhecida como Síndrome Velocardiofacial (SVCF) (OMIM192430) ou de DiGeorge (OMIM 188400), e é a síndrome de microdeleção mais comum na população, com incidência de aproximadamente 1:4.000 (RUITER et al., 2003; REPETTO et al., 2014). Os principais acometimentos clínicos, além da FOT e outras anomalias palatais, como incompetência/insuficiência velofaríngea, incluem cardiopatias congênitas, deficiência cognitiva, imunodeficiências, hipocalcemia, doenças psiquiátricas, entre outros. Entretanto, há uma grande variação clínica entre os acometidos. Tem muita importância nas políticas de saúde por constar como diagnóstico diferencial no pré-transplante cardíaco e nas condições de imunodeficiência (BACAL et al., 2009; BRASIL, 2009 – Portaria MS/MG nº2600). Também, é considerada de grande importância médica pela relação da região deletada com alterações cognitivas e de comportamento (VANGKILDE et al., 2016).

1.2 Atendimento de pacientes com FOT no Brasil

A Portaria SAS/MS nº62, de 19 de abril de 1994, habilita hospitais (centros habilitados de referência) com condições físicas, estruturais, de equipamentos e de recursos humanos para prestar o atendimento aos pacientes com FOT, com oferta de atendimentos clínico, cirúrgico e de reabilitação adequados e de qualidade. Porém, o número de hospitais (28) credenciados no Sistema Único de Saúde (SUS) para atendimento de indivíduos com tais afecções é ainda baixo considerando-se, as necessidades e demanda da população. Tais hospitais devem realizar procedimentos integrados para reabilitação estético-funcional dos portadores de FOT (CNES, 2018).

A distribuição dos centros de referência habilitados pelo SUS é heterogênea e dispersa: um centro na região Norte, quatro no Centro Oeste, quatro no Nordeste, sete no Sul e 12 na região Sudeste do país, estando nove centros de atendimento concentrados no estado de São Paulo, o estado com a maior concentração (Tabela1). Dos 28 centros habilitados, três deles (um em São Bernardo do Campo/SP, um em Campo Grande/MS e um em Itapetininga/SP) só fazem atendimento ambulatorial – estes estão vinculados à Fundação para o Estudo e Tratamento das Deformidades Crânio-Faciais (FUNCRAF) e a parte cirúrgica é realizada no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais de Bauru (HRAC/Centrinho).

Os pacientes brasileiros acometidos por fendas orais devem ser registrados no Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC). De 2010 a 2016 foram registrados 10.816 novos casos com fenda labial e fenda palatina (<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>). Porém, se for considerada a incidência assumida pelo SINASC para a população brasileira, de 1:650 nascidos vivos, seriam esperados entre 2010 e 2015 cerca de 27.049 casos. Assim, há uma subnotificação de casos pelos serviços de saúde, além do fato de que as fendas submucosas muitas vezes não são investigadas ou detectadas ao nascimento.

A atenção básica e de média complexidade para pessoas afetadas não estão estruturadas ou totalmente consolidadas, mesmo o SUS garantindo assistência integral a essas pessoas por meio da Portaria SAS/MS nº62. Por tais motivos, muitos pacientes acessam apenas tratamento em hospitais de alta complexidade e universitários que, embora tragam benefícios individuais, não configuram uma política de saúde capaz de modificar o cenário de iniquidade e fragmentação nesta área.

A avaliação genética de indivíduos com afecções orofaciais é fundamental não só para melhorar a acurácia dos diagnósticos, em vista do planejamento terapêutico e Aconselhamento

Genético, mas também para o esclarecimento da etiologia e de fatores de risco, tendo em vista a prevenção no nível individual e populacional (GIL-DA-SILVA-LOPES; MONLLEÓ, 2014). Entretanto, dados epidemiológicos requeridos para programas de saúde pública são escassos no Brasil, mesmo no estado de São Paulo onde há vários centros de referência para atendimento e pesquisa.

Tabela 1. Centros de referência habilitados e credenciados para atendimento de indivíduos com fendas labiopalatais e data do credenciamento.

UF	ESTABELECIMENTO	DATA
BA	HOSPITAL SANTO ANTÔNIO	11/2003
CE	HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN	11/2008
DF	SARAH BRASILIA	02/2002
MG	HOSPITAL DA BALEIA	03/2006
MG	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALZIRA VELANO	08/2003
MS	FUNCRAF	03/2001
MT	HOSPITAL GERAL UNIVERSITÁRIO/CUIABÁ	10/2008
MT	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MULLER	04/2014
PE	IMIP – INSTITUTO MATERNO INFANTIL	10/2002
PI	HOSPITAL SÃO MARCOS	07/1994
PR	HOSPITAL DO TRABALHADOR/CURITIBA	09/2003
PR	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO OESTE DO PARANÁ	01/2018
RJ	SMS HOSPITAL MUNICIPAL NOSSA SENHORA DO LORETO	12/2000
RS	HOSPITAL BRUNO BORN	08/1999
RS	HOSPITAL DO CÍRCULO	08/2011
RS	HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEIÇÃO SA	08/2003
RS	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ULBRA	03/2010
SC	HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO	12/1999
SC	HOSPITAL REGIONAL HANS DIETER SCHMIDT	06/2001
SP	FUNCRAF ITAPETININGA	06/2001
SP	FUNCRAF SÃO BERNARDO DO CAMPO	06/2001
SP	HC DA FMUSP HOSPITAL DAS CLÍNICAS/SÃO PAULO	09/2003
SP	HOSPITAL DE BASE DE SÃO JOSE DO RIO PRETO	12/2013
SP	HRAC/BAURU	09/1993
SP	HOSPITAL DE ENSINO DA UNIFESP/SÃO PAULO	01/1997
SP	SANTA CASA DE ARARAQUARA	11/2007
SP	SANTA CASA DE PIRACICABA	12/2001
SP	SOBRAPAR CAMPINAS	09/1993
TO	HOSPITAL REGIONAL DE ARAGUAÍNA	07/2003

Fonte: Adaptada de Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde – CNES. Disponível em http://cnes2.datasus.gov.br/Mod_Ind_Habilitacoes_Listar.asp?VTipo=0401&VListar=1&VEstado=00&VMun=&VComp=&VContador=28&VTitulo=H.

Os pacientes com anomalias craniofaciais requerem um plano de gerenciamento a longo prazo (Tabela 2) e acompanhamento de profissionais de várias especialidades médicas e cirúrgicas altamente especializados – pediatras, otorrinolaringologistas, cirurgiões plásticos, ortodontistas, fonoaudiólogos, geneticistas, psicólogos, radiologistas, protéticos – visando uma reabilitação morfológica, funcional e psicossocial. Tais indivíduos frequentemente precisam ser submetidos a múltiplas intervenções cirúrgicas e muitas vezes são necessárias terapias de apoio, como fonoaudiologia, terapia ocupacional, psicoterapia, entre outros, desde a infância até o início da idade adulta (BURG et al., 2016).

1.3 Projeto Crânio-Face Brasil e Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais

Com base nas necessidades identificadas na população com FOT, em 2003 foi criado no Brasil um projeto denominado Projeto Crânio-Face Brasil (UNICAMP - PCFB - <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>), construído a partir de diversos projetos colaborativos, coordenado pelas Profas. Dras. Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes (UNICAMP) e Isabella Monlleó (UFAL).

Desde o início do PCFB, os pesquisadores que o compõem, responsáveis pelos centros participantes, de diversas regiões do país, entre eles a orientadora deste mestrado, tem realizado a investigação diagnóstica de anomalias craniofaciais, com apoio financeiro de diversas agências de fomento (FONTES et al., 2013; FONTES, 2016; MOLCK et al., 2013; MONTEIRO et al., 2013; VIEIRA et al., 2013; SGARDIOLI et al., 2015). Além da investigação diagnóstica, este Projeto, em colaboração com a OMS, desenvolveu e validou a Base Brasileira de Dados Clínicos e Familiares de Fendas Orofaciais.

Com apoio do PPSUS/Fapesp (2012/51799-6), a base de dados foi remodelada e ampliada, dando origem a Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais (BBAC) que conta com doze centros participantes do PCFB, sendo o Hospital de Base de São José do Rio Preto um deles, sob responsabilidade da Dra. Agnes Cristina Fett Conte (MONLLEÓ et al., 2013). A BBAC usa um protocolo uniformizado amplo, baseado nas recomendações da OMS, para coleta de dados e avaliação de pacientes com anomalias craniofaciais em todos os locais de atendimento (centros).

Tabela 2. Tipos de tratamentos para fendas orais, com base nas recomendações do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/Centrinho/USP).

Idade	Médico Clínico	Odontologia	Cirurgia	Fono	Atendimentos complementares
Gestante	E+O (cirurgia plástica)	E+O		E+O	E+O (psicologia, enf, nutrição e SS)
0-4 semanas		A (inicial)			Ac (psicologia, enf, nutrição, SS e genética); exames laboratoriais
1-6 meses	Consulta pediátrica	A	Cirurgia lábio (aos 3 meses de idade)	Orientação	Exame citogenético+As (SS, enf, fisioterapia, terapia ocupacional e nutrição)
12-18 meses		Odontoped; Asc	RT (cirurgia palato)	Triagem e orientação	Ac continuado + As (psicologia, SS, nutrição, fisioterapia, terapia ocupacional e enf)
18-24 meses			RT (cirurgia plástica)	A (fala/ linguagem) Terapia	Ac +As (psicologia, enf, nutrição e SS)
≥ 2 anos	A (médica-rotina e/ou pré-cirúrgica)	Odontoped Asc		A (audiológica) TC	As (enf, psicologia, SS e nutrição); aplicação de testes e promoção do aprendizado
4-6 anos	A (médica-rotina e/ou pré-cirúrgica)	A Ort (se necessário) e documentação (fotos, modelos)	Faringoplastia; Cirurgias secundárias; Alongamento de columela	TC	As (psicologia, enf, nutrição e SS)
7-8 anos	A (médica-rotina e/ou pré-cirúrgica)	Odontoped (moldagem); A Ort (indicação enxerto ósseo alveolar, se necessário), RX	RT	TC	As (psicologia, enf, nutrição e SS)
10-12 anos		Odontoped, Odontologia geral, Ort, Cirurgia bucomaxilofacial (enxerto alveolar secundário), RX	RT (cirurgia plástica)	A (fala e audição)	Reavaliação aprendizado escolar + As (enf e nutrição)
12-16 anos	Consulta médica	Clínica odontológica (especialidades), RX	Rinoplastia e/ou septoplastia	A (fala e audição, se necessária)	As (psicologia, enf, nutrição e SS)
16-18 anos	TC	Cirurgia ortognática Clínica odontológica, RX	Revisão da rinoplastia e/ou septoplastia	A (fala e audição, se necessária)	As (enf, psicologia e nutrição)

Legenda: A: avaliação; Ac= aconselhamento; As: avaliações; Asc: assistência continuada; Enf: enfermagem; E+O: Entrevistas e orientações; RT: Revisão do tratamento; SS:Serviço Social; TC: tratamento contínuo; Odontoped: odontopediatria; Ort: ortodontia.

Para coletar e gerenciar os dados da base, incluindo também informações sobre exames genéticos realizados, foi desenvolvida uma aplicação baseada na Web, chamada CranFlow® - *Craniofacial Anomalies: registry, flow and management* (registro no Instituto Nacional de Propriedade Industrial número BR 51 2015 000550 2). Essa ferramenta criou condições para a participação multiprofissional mais efetiva e conta com doze centros colaboradores envolvendo diferentes profissionais da saúde nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Todos os dados recebem curadoria de profissional treinado. A BBAC e a CranFlow® permitem a abordagem de morbimortalidade em doenças raras de maneira consistente e apropriada em saúde pública, já que coleta dados de fatores de risco, etiológicos, epidemiológicos, registra investigação laboratorial e permite o seguimento longitudinal dos indivíduos, caracterizando a história natural e necessidades relacionadas a estas anomalias (VOLPE-AQUINO et al., 2018).

O centro colaborador HB-FAMERP/FUNFARME, na pessoa da Dra. Agnes Conte, responde também pelo atendimento genético de fissurados atendidos no CLAP (Centro de Reabilitação de Fissuras Labiopalatais) do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HOSPITAL DE BASE, 2018), que foi credenciado pelo Ministério da Saúde, em 2013, como centro de referência em fissurados (CNES, 2018). Ainda, a BBAC e a CranFlow® envolvem estratégias modernas e mundialmente reconhecidas como apropriadas para abordar doenças raras.

Entretanto, há muito a ser explorado a partir dos dados inseridos na BBAC, de forma retrospectiva e prospectiva, como as características etiológicas e epidemiológicas das diferentes populações das diferentes regiões dos centros participantes, os dados do espectro fenotípico relacionados aos diferentes grupos de anomalias orofaciais e as condições de comorbidade e de acesso à saúde.

Neste contexto, a hipótese científica que foi testada neste trabalho é que existem variações epidemiológicas e etiológicas importantes na população de afetados com fendas orais que apresentam dificuldades de acesso à saúde e a tratamentos e necessidades especiais que, uma vez identificadas, podem caracterizar melhor esta população e nortear políticas públicas.

2. OBJETIVOS

Geral

Investigar características epidemiológicas, fatores etiológicos, necessidades e dificuldades de acesso a tratamentos de indivíduos com fendas orais típicas (FOT) síndromicas e não síndromicas, inseridos na BBAC/CranFlow[®]/SJRP, para ampliar conhecimentos científicos sobre tais afecções e auxiliar no diagnóstico, prognóstico e acesso a tratamento dos afetados.

Específicos:

1. Identificar características epidemiológicas de indivíduos com FOT síndromicas e não síndromicas como sexo, ascendência étnica, procedência e renda familiar;
2. Investigar os fatores etiológicos com base nos dados gestacionais, pessoais, familiares e em investigações genéticas laboratoriais, de acordo com o indicado em cada caso;
3. Levantar os principais aspectos vinculados ao acesso a tratamentos dos afetados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo longitudinal, descritivo e retrospectivo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP (CAAE: 76875117.7.0000.5415).

Foram estudados todos os casos registrados neste centro participante inseridos de 2014 a 2016 e casos novos, inseridos de 2017 a 2018, somando 70 pacientes com FOT síndrômicas (48) e não síndrômicas (22), independente do sexo, etnia e classe social. As informações dos casos foram coletadas, “caso por caso” por meio do preenchimento on-line da base de dados na primeira e consultas subsequentes.

O número de indivíduos estudados dependeu da quantidade de pacientes com FOT atendidos, além da disponibilidade e adesão dos mesmos ao projeto. Os principais motivos para não adesão das famílias convidadas foram dificuldades financeiras e de transporte, uma vez que muitos pacientes não residem em São José do Rio Preto, além das dificuldades na disponibilidade de horário e falta de interesse em participar. A inserção dos casos ocorreu por meio de mutirões realizados pela orientadora e pela autora do projeto em três sextas-feiras de outubro/2017 e em cinco segundas-feiras de abril, maio e junho/2018.

A subdivisão em FOT síndrômicas e não síndrômicas dependeu da presença de DCs estruturais e/ou do desenvolvimento associados. Considera-se FOT síndrômicas quando há qualquer combinação de dois ou mais defeitos graves devido a um fator etiológico único já demonstrado ou fortemente suspeito, com base em sua recorrência em determinado número de casos, e FOT não síndrômicas ou isoladas quando não há associação com outros DCs. Uma síndrome é considerada conhecida quando uma denominação específica pode ser atribuída ao quadro clínico e este pode ser codificado usando a CID 10 (Classificação Internacional de Doenças) e/ou a base Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). As definições dos grupos seguem os critérios que constam na BBAC/CranFlow®.

Foram incluídos indivíduos atendidos pelo Serviço de Genética e CLAP do Hospital de Base com FOT ou sinais sugestivos de SD22q11.2. Os critérios de inclusão foram indivíduos de qualquer idade com fenda labial, fenda palatal, fenda labiopalatal ou síndrome de Pierre-Robin em apresentação isolada, como componente de síndrome, como componente de defeitos múltiplos (DMs) ou como componente de defeitos aditivos randômicos (MONLLEÓ et al., 2013). A indicação de triagem nos indivíduos com quadro sugestivo de SD22q11.2 seguiu os critérios apresentados no Tabela 3.

Tabela 3. Critérios para indicação de triagem para a SD22q11.2.

Coluna 1 – Indicações absolutas para a pesquisa da deleção	Coluna 2 – Manifestações centrais das 22Q11.2DS	Coluna 3 – Manifestações associadas as 22q11.2DS
Qualquer item desta coluna	Presença de dois ou mais itens da Coluna 2 OU um item da Coluna 2 e ao menos dois da Coluna 3	Presença de dois ou mais itens da Coluna 3 e ao menos um da Coluna 2 OU quatro ou mais itens da coluna 3 *
A. Cardiopatia congênita de alto valor preditivo positivo para a deleção: interrupção de arco aórtico tipo B, Truncus arteriosus e/ou Defeito de septo interventricular com atresia pulmonar (Tetralogia de Fallot com atresia pulmonar) B. Hipocalcemia neonatal secundária a hipoparatiroidismo idiopático	C. Outros defeitos Conotruncais: Tetralogia de Fallot clássica, Defeito de septo interventricular com mal-alinhamento posterior, Defeito de septo interventricular com estenose pulmonar, Defeito de septo interventricular subarterial/subpulmonar e/ou Coarctação aórtica. D. Alterações Palatais: Insuficiência Velofaríngea, fenda palatal aberta ou submucosa e/ou fenda labiopalatal E. Imunodeficiência comprovada laboratorialmente ou alterações tímicas – hipoplasia/aplasia tímica F. Face característica com quatro ou mais dismorfismos característicos, sendo ao menos três dentre os seguintes: Face alongada, pálpebras “hooded”, nariz tubular ou outra forma de nariz típico, hipoplasia alar. G. Esquizofrenia	H. Alterações neurocognitivas: Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, atraso de linguagem e/ou dificuldade de aprendizagem. I. Alterações cardiovasculares: Alterações de arco aórtico e/ou alterações de vasculatura arterial pulmonar. J. Dois ou mais dismorfismos sugestivos das 22q11.2DS (≥ 2 anos) OU um ou mais dismorfismos sugestivos das 22q11.2DS (≤ 2 anos) K. Voz anasalada L. Outras cardiopatias: outros defeitos de septo interventricular, Dupla saída de ventrículo direito, Transposição de grandes artérias, Comunicação interatrial e/ou Forame oval pérvio M. Outras alterações palatais: Úvula bifida isolada e/ou fenda labial. N. Malformações de Trato genitourinário

*Em pacientes abaixo de um ano de idade: presença de um ou mais itens da coluna 3 e ao menos um da coluna dois OU quatro ou mais itens da coluna 3.

Fonte: Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/acesso-base-de-dados-digital-cranflow>.

Os critérios de exclusão foram indivíduos com FOT atípicas (fendas faciais mediana, oblíqua, transversal, entre outras), holoprosencefalia, fenda de úvula e aqueles dos quais não se obteve o TCLE.

3.2 Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais

Para a obtenção de informações sobre as FOT, a BBAC utiliza um manual operacional desenvolvido por este grupo de pesquisa e baseado em estudos prévios do Collaborating Center for Craniofacial Anomalies Research, Universidade de Dundee, Escócia (WHO). As informações compreendem dados demográficos, história gestacional, do parto, neonatal e familiar, características clínicas e os resultados de exames complementares e genéticos.

A codificação é realizada conforme o sistema de códigos do International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (ICBDMS, 2002). O Human Phenotype Ontology (HPO) é utilizado para descrever os sinais clínicos encontrados nos pacientes. Para codificar os diagnósticos, utiliza-se a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e Online Mendelian Inheritance in Man – OMIM (<https://www.omim.org/>). O CranFlow® atende aos requisitos de segurança estabelecidos para dados médicos (VOLPE-AQUINO et al, 2018).

3.3 Investigação das características epidemiológicas e histórico gestacional

As características epidemiológicas como procedência, sexo, ascendência étnica e renda familiar (em salários mínimos - SM) dos pacientes do centro denominado Hospital de Base foram obtidas a partir dos dados inseridos na BBAC/CranFlow®.

Informações sobre o tipo, a lateralidade das fendas, histórico gestacional também foram analisadas. Foram mapeados fatores de risco para fendas orais para a população estudada, sendo estes: consanguinidade parental, dados obstétricos, ingestão de álcool, drogas ilícitas, tabaco durante a gestação, diagnóstico materno gestacional, idade na concepção e uso de medicamentos ou exposição a substâncias durante a gestação.

3.4 Investigação de fatores etiológicos

As possíveis etiologias foram investigadas com base nos dados clínicos, histórias médicas e resultados de exames, conforme indicação de cada paciente, que constam na BBAC/CranFlow®/SJRP.

A avaliação dos sinais clínicos e investigação dos fatores etiológicos é de responsabilidade da coordenadora do centro colaborador HB-FAMERP/FUNFARME (Dra. Agnes C. F. Conte), de acordo com protocolo utilizado no Serviço de Genética da mesma Instituição e segue as diretrizes do questionário da BBAC/CranFlow[®], onde constam aproximadamente 192 questões.

3.5 Aspectos vinculados ao acesso e necessidade de tratamentos

A partir dos dados da BBAC/CranFlow[®] foi realizado um levantamento dos principais aspectos vinculados ao acesso a tratamentos e necessidades de saúde dos pacientes da Base de dados. Foram averiguados a época do diagnóstico da fenda considerando o tipo da mesma, o início do acompanhamento especializado, acesso a primeira intervenção cirúrgica e a realização de terapias de apoio: fonoterapia e outras (psicoterapia, terapia ocupacional, hidroterapia e equoterapia).

Durante a entrevista foi investigado com os genitores dos pacientes do centro denominado Hospital de Base quais suas necessidades e principais dificuldades de acesso a saúde, como tratamento cirúrgico, fonológico, nutricional, entre outros.

3.6 Análise laboratorial

As técnicas foram utilizadas de acordo com a necessidade de cada caso, e incluíram: Cariótipo, FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*), MLPA (*Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*) e a-CGH (*array Comparative Genomic Hybridization*).

Após obtenção do TCLE, avaliação clínica e registro na BBAC foram colhidos de 08 a 16 mL de sangue periférico dos pacientes, em tubos contendo heparina e EDTA.

Dependendo da indicação e da hipótese diagnóstica, os tubos com heparina foram encaminhados para exames genéticos, cariótipo com bandas e FISH, que foram realizados no Laboratório de Genética (HB/FUNFARME), sob chefia da orientadora deste projeto.

A análise do cariótipo em bandamento GTG de linfócitos cultivados seguiu protocolo de rotina do referido Laboratório.

No caso de exame FISH também foram utilizados linfócitos cultivados e a sonda específica para a região 22q11.2 (TUPLE1 ou TBX1), conforme recomendações do fabricante, com modificações. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência da Olympus[®] com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o software FISH View da Applied Spectral Imaging[®].

Os tubos com EDTA foram encaminhados à sede do PCFB, por empresa autorizada para o transporte de material biológico, para compor o Biorrepositório de DNA de indivíduos com FOT, utilizado para outras investigações moleculares, a critério clínico e de acordo com projetos novos e em andamento.

No centro coordenador, de acordo com o indicado em cada caso e solicitado pelo centro participante, foi realizado o MLPA - *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification* (Amplificação de sondas Dependente de Ligação) e o array-CGH – *array Comparative Genomic Hybridization* (Hibridação Genômica Comparativa em arrays) em alguns indivíduos, de acordo com o protocolo dos fabricantes.

A técnica MLPA foi utilizada para a investigação de microdeleção em 22q11.2 em alguns casos (17 indivíduos) e utilizou o Kit P250-B1 DiGeorge (MRC-Holland®, Amsterdam, The Netherlands), corrida em ABI 3500xL e software *GeneMapper*® (*Applied, Biosystems*™). A análise foi realizada em planilha de Excel (*Microsoft*®) – desenvolvida pelo grupo do *National Genetics Reference Laboratory* - Manchester.

A técnica array-CGH utilizou os chips CytoScan™ 750K Array, CytoScan™ HD Array ou Genome-Wide Human SNP Array 6.0™ (*Affymetrix*®, Santa Clara, CA, USA). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS versão 3.1.0.15 (r6634) – *Affymetrix*) (hg19) por comparação com dados de 380 indivíduos controle (HapMap; BioServe Biotechnologies) e 117 indivíduos controles da população brasileira (CytoScan™ HD). Foram consideradas para análise somente duplicações (dup) e deleções (del) com os números mínimos de 25 sondas como indicativo confiável para perda e de 50 sondas para ganho. A técnica de a-CGH possibilita a avaliação de alterações no número de cópias do DNA de praticamente todo o genoma humano. A técnica do a-CGH foi realizada em 13 pacientes.

No centro coordenador, em alguns casos foi realizada a técnica de FISH, com sondas DiGeorge/VCFS TUPLE1+22q13.3 Deletion Probe Combination (*Cytocell Aquarius*® ou *Visys Abbott*®). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência BX51-BF-II/BX2 da Olympus® e as imagens capturadas utilizando o software FISHView da Applied Spectral Imaging®.

Em um caso, foi utilizado o Kit P250-A1 DiGeorge (MRC-Holland MLPA®) para a realização do MLPA e sonda BAC RP11-540E4 e RP11-241P1 e Poseidon MDIGF1R (*Kreatech Diagnostics*, Amsterdã, Holanda) na realização do exame de FISH.

Em um caso, foi utilizada a sonda WHS Critical Region Probe (4p16.3) com sonda específica subtelomérica (4qter) para investigação por FISH no braço curto do cromossomo 4. O resultado encontrado foi 46,XX,del(4)(p16.3)(WHSCR-).

Cariótipo com bandamento-GTG foi realizado em 57 dos 70 indivíduos (81,43%), enquanto o exame FISH com sonda específica para a região 22q11.2 (TUPLE1 ou TBX1) foi realizado em 21 dos 70 (30,00%), MLPA em 17 (24,86%) e 13 casos foram submetidos ao a-CGH (18,57%).

3.7 Análise estatística

Os dados coletados foram colocados em planilhas no Excel e agrupados de acordo com os grupos de afecções: FOT síndrômicas e não síndrômicas. Dentro de FOT, os pacientes foram colocados em três classes: FLP (pacientes com fenda labiopalatal), FL (pacientes com fenda labial) e FP (pacientes com fenda palatal) quando necessário.

Foi realizada análise exploratória de dados através de medidas resumo (média, desvio padrão, mínimo, mediana, máximo, frequência e porcentagem). Os grupos foram comparados através dos testes exato de Fisher e Qui-Quadrado. Os dados quantitativos foram analisados utilizando medidas de tendência central e dispersão.

O programa para a realização das análises foi o SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

Todas as análises foram calculadas com intervalo de confiança (IC) de 95% e o nível de significância foi de 5%, ou seja, com o valor de $p < 0,05$.

3.8 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/FAMERP, CAAE: 76875117.7.0000.5415, em outubro de 2017. Está vinculado aos projetos “Proposta para inserção da Genética Clínica na atenção de portadores de anomalias craniofaciais no Sistema Único de Saúde” e “Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais”. Ambos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP (059/2008), pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (709/2008) e pelos demais centros participantes. Os números de registro na Plataforma Brasil são, respectivamente, CAAE 35316314.9.1001.5404 e CAAE 85020018.8.3003.5415.

A participação dos sujeitos, de qualquer idade ou sexo, esteve condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), anexo na plataforma na Base de Dados, de acordo com a sua respectiva afecção: FOT ou Del22q11.2.

As amostras de sangue periférico coletadas nos setores especializados do Hospital de Base, ao chegarem no Laboratório de Genética, receberam um código de identificação para privacidade da identidade, o qual é de conhecimento apenas dos pesquisadores.

Os resultados das investigações laboratoriais realizadas foram transmitidos à família/responsável pela geneticista orientadora deste projeto, em sessão de Aconselhamento Genético previamente agendada.

As entrevistas para obtenção dos dados foram realizadas pela aluna e sua orientadora.

Não houve qualquer tipo de gratificação pela participação dos indivíduos no estudo.

As informações obtidas são mantidas como confidenciais e a identidade de todos os indivíduos será preservada em publicações científicas originadas a partir deste estudo.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos resultaram em três artigos científicos, aqui apresentados como capítulos.

O artigo intitulado “*Health aspects of individuals with oral cleft who attended a new Brazilian center*”, apresentado no Capítulo I, refere-se aos achados correspondentes ao estudo das características epidemiológicas, fatores etiológicos, necessidades e dificuldades de acesso a tratamentos de indivíduos com FOT sindrômicas e não sindrômicas, inseridos na BBAC/CranFlow[®]/SJRP, relacionados aos objetivos específicos do projeto. O artigo foi submetido ao *The Clef Palate-Craniofacial Journal* em janeiro de 2019 e está apresentado de acordo com as normas da revista.

O artigo intitulado “*Deleção em 3p26.1 envolvendo o gene GRM7 associada com fenda oral e alterações de comportamento*” refere-se a um *clinical report* de um dos casos da casuística e está apresentado no Capítulo II. Atende ao objetivo 2, pois trata-se de um achado etiológico inédito na literatura. Será submetido ao *American Journal of Medical Genetics - Part A (AJMG)*.

O artigo que consta no Capítulo III é intitulado “*Syndromic oral clefts: challenges of genetic assessment in Brazil*” e foi submetido ao *Public Health Genomics Journal* em dezembro de 2018 e está apresentado de acordo com as normas da revista. Este artigo objetivou investigar as dificuldades da atenção a indivíduos com Fendas Orais Sindrômicas (FOS) no Sistema Único de Saúde (SUS) e descrever um modelo de investigação genética baseado na BBAC. A casuística foi composta de indivíduos de todos os centros colaboradores, inclusive, de São José do Rio Preto. A autora desta dissertação e sua orientadora participaram do estudo e da redação do artigo, que atende ao objetivo 3. É apresentado nesta dissertação de maneira inédita.

As discussões e conclusões específicas de cada assunto constam nos artigos referidos.

HEALTH ASPECTS OF INDIVIDUALS WITH ORAL CLEFT WHO ATTENDED A NEW BRAZILIAN CENTER

Marina Cristine Cano Francisquetti M.Sc., Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes M.D., M.Sc.,
Ph.D., Agnes Cristina Fett-Conte, M.Sc., Ph.D.

Francisquetti M.C.C., from the Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (Unesp), São José do Rio Preto-SP, Brazil. Dr. Gil-da-Silva-Lopes V.L., from the Department of Medical Genetics, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil. Dr. Fett-Conte A.C. from the Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto-SP, Brazil.

Corresponding address: Marina Cristine Cano Francisquetti, from the Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (Unesp), São José do Rio Preto; Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP 15.054-000, São José do Rio Preto-SP, Brazil. E-mail: mafrancisquettibio@gmail.com.

Financial support: Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – Finance code: 131906/2017-8.

Acknowledgments: We thank the patients who participated in this study, the entire teams of the Base Hospital and of Brazil's Craniofacial Project. We also thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 131906/2017-8) for its financial support and *Espaço da Escrita – Pró-Reitoria de Pesquisa (UNICAMP)* for the language services provided. The authors declare there were no conflicts of interest.

ABSTRACT

Objective: To study the epidemiological and clinical aspects, the risk factors and treatment access from Brazilian patients with typical orofacial clefts (OFCs) in the Brazilian Database of Anomalies Craniofacial (BDAC).

Design: This is a retrospective descriptive cohort study.

Setting: Interdisciplinary orofacial cleft collaborative center at a tertiary-care hospital.

Patients: A total of 70 syndromic and nonsyndromic individuals with typical orofacial clefts.

Methods: Interviewing and genetic testing using a standard instrument from database focused on epidemiological, clinical and genetic data and risk factors.

Results: Most individuals were syndromic (68.57%), of native ancestry, from lower middle class, who presented no familial recurrence. All the types of OFCs contributed to a higher affection rate among males. There was a significant difference in the types of OFCs concerning sex. We identified etiological factors in 54.16% of syndromic cases. There was no significant difference regarding the risk factors of syndromic and nonsyndromic individuals. There was a delay in diagnosis time and in the access to treatments in most of cases.

Conclusions: Most of our results corroborate to others previously described in the literature. There is a lack of information on orofacial clefts, which consequently leads to delays in its diagnosis and in the access to its treatment. A database focused strategy may be useful to identify the important characteristics of such defects. The results can contribute to the planning of public policies aimed at overcoming inequities and improving the quality of life of those affected and their families.

KEYWORDS: cleft lip, cleft palate, health care.

INTRODUCTION

Typical orofacial clefts (OFCs) are common birth defects (BDs) resulting from the complex interaction of multiple genetic and environmental risk factors. In addition, individuals born with an orofacial cleft have higher incidence of mental health problems and higher overall mortality rates at all stages of life, even in developed countries with good medical care (Beaty et al., 2016).

Its incidence varies depending on geographic, racial, ethnic, environmental, and socioeconomic characteristics. In Brazil, the main prevalence is 5.86 per 10,000 live births, but these rates vary in different Brazilian geographic regions (Abreu et al., 2016; Sousa and Roncalli, 2017).

One can find OFCs in isolate or in association with multiple BDs, as part of syndromes. In general, cases of cleft palate (CP) are more common when associated with other BDs than cases of cleft lip (CL) or CL combined with CP (CLP). From these cases, almost 50% are multiple congenital anomalies without a specific diagnosis, while the remaining ones correspond to syndromic cases of chromosomal, genetic or teratogenic etiology (Leslie and Marazita, 2013; Joubert et al., 2016).

Numerous environmental factors have already been suggested as contributing to the genesis of OFCs, such as intrauterine exposure to anticonvulsants, retinoic acid, alcohol, tobacco, and maternal diabetes (Bilińska and Osmola, 2015). However, Burg et al (2016) points out folic acid supplementation during early pregnancy as a protective factor. Environmental factors account for 70 to 80% of the cases, while the genetic component is the main causal factor with 25 to 30% of the cases (Rodrigues et al., 2009). In addition, familial recurrence is very common among patients with OFCs and their relatives present a higher risk when compared to the general population (Blencowe et al., 2018; Silva et al., 2018).

OFCs not only provoke an aesthetic distortion of the facial appearance, but may also interfere and negatively affect individual's regular activities, especially feeding, hearing and speech, besides predisposing them to infections, abnormal facial growth and possible psychological disorders (Gatti et al., 2017; Silva et al., 2018). The variety of clinical conditions within OFCs, together with the different severity degrees and the possible associations with syndromes and other BDs result in specific therapeutic protocols and require the involvement of a multidisciplinary team of health professionals (Sousa and Roncalli, 2017). Patients with craniofacial anomalies need a long-term management and follow-up plan with professionals from various medical and surgical specialties. Such individuals often need to undergo multiple

surgical interventions and support therapies from childhood to early adulthood, such as speech therapy, occupational therapy, and psychotherapy (Burg et al., 2016).

To genetically evaluate individuals with OFCs is fundamental not only to improve the accuracy of the diagnoses and to recognize comorbidity conditions based on therapeutic planning and Genetic Counseling, but also to clarify the etiology and risk factors aimed at prevention (Burg et al., 2016). Nonetheless, epidemiological data required to assist public health care programs are scarce in Brazil, even in the state of São Paulo, where there are many reference health centers and research centers. Despite providing some assistance, they do not present a health policy capable of modifying the current scenario (Ise et al., 2018).

Based on the needs identified in the Brazilian population, a project called Brazil's Craniofacial Project – BCFP (<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>) was created in 2003 gathering collaborative centers from different regions of the country (research centers, universities and hospitals) (Monlleó et al., 2013). In addition to the diagnostic investigation, partnered with the World Health Organization (WHO), the project developed and validated the Brazilian Database on Orofacial Clefts with clinical and family data. It was expanded, giving rise to the Brazilian Database of Craniofacial Anomalies (BDCA), which uses a broad standardized protocol, according to WHO recommendations for data collection and assessment of patients with craniofacial anomalies in all centers. A Web-based application called CranFlow[®] (registered by the National Institute of Industrial Property, number BR 51 2015 000550 2) was developed to collect and manage base data, allowing the approach of morbidity and mortality in rare diseases in a consistent and appropriate manner within public health, as it collects data on risk factors, etiological, epidemiological and laboratory investigation records and allows the longitudinal follow-up of individuals, characterizing the history and needs regarding these anomalies, including information on genetic testing. This tool created conditions for more effective multiprofessional participation and has twelve collaborating centers involving different health professionals in the Northeast, Southeast and South regions of Brazil (Volpe-Aquino et al., 2018). The Hospital de Base (HB) is one of these centers, a university hospital, where most patients receive health care from the *Sistema Único de Saúde* (SUS), Brazil's public unified health care system.

However, there is more to explore from the data inserted in the BDCA, considering the wide variety of etiological and epidemiological characteristics of populations from various regions and phenotypic spectrum data from different groups of orofacial anomalies. Thus, this study aimed at studying the clinical and epidemiological characteristics, the risk factors, the treatment access of syndromic and non-syndromic individuals with OFCs in the

BDCA/CranFlow[®] of the Hospital de Base, accredited by the Brazilian Ministry of Health as a reference center for OFCs since 2013 (CNES, 2018; Hospital de Base, 2018).

METHODS

This retrospective descriptive cohort study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto (CAAE: 76875117.7.0000.5415). All adult subjects and/or legal guardians of underage patients signed a Written Informed Consent Form (WICF).

We studied 70 cases aged from one month to 47 years with OFCs and registered in BDCA/CranFlow[®] (<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>), from 2014 to 2018. They were recruited from Hospital de Base (HB-FAMERP/FUNFARME), a tertiary-care hospital located in São José do Rio Preto, São Paulo. This database uses a standardized protocol based on the WHO recommendations for data collection and the evaluation of patients with OFCs. The database is updated by 12 collaborating centers from different parts of Brazil, one of these centers being HB.

The adopted inclusion criteria comprises individuals of any age with CL (cleft lip), CP (cleft palate), CLP (cleft lip with cleft palate) in isolate, or as a part of a syndrome, or of multiple BDs and random additive defects (Monlleó et al., 2013). The exclusion criteria comprised individuals with atypical OFCs (median, oblique, transverse, and others), holoprosencephaly, uvula cleft, and those who have not signed the Written Informed Consent Form (WICF).

Individuals with OFCs who previously attended the Genetic Outpatient Clinic of the HB were contacted and invited to participate in the study and an interview was performed to obtain data. We carried out interviews with the affected individuals and/or their parents by following the questionnaire guidelines by BDCA, which approaches 192 items, including information regarding demography, the gestational and neonatal periods, delivery, familial recurrence, clinical characteristics and the results of complementary and genetic exams. The coding was performed based on the code system of the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (ICBDSR, 2018). Human Phenotype Ontology (HPO - <https://hpo.jax.org/app/>) was used to describe the clinical signs found in patients. The International Classification of Diseases (CID-10) and Online Mendelian Inheritance in Man - OMIM (<https://www.omim.org/>) were used to code the diagnoses. CranFlow[®] meets the established safety requirements for medical data (Volpe-Aquino et al, 2018).

Group definitions also followed the criteria employed in the BDCA/CranFlow[®]. The subdivision into syndromic and non-syndromic OFCs depended on the presence of associated

structural and/or developmental congenital defects (CDs). OFCs were considered syndromic when there was any combination of two or more serious defects due to a single etiologic factor already demonstrated or highly propable based on its recurrence in a number of cases; when not associated with other BDs, OFCs were considered as non-syndromic or isolated OFCs.

Epidemiological characteristics such as origin, sex, ethnic background and family income (in minimum wage) of patients in the HB center were obtained from BDCA/SJRP data. Information on the type and laterality of clefts, and on gestational history, were also analyzed. Some patients of low cultural level attended the center in their adult phase, after surgical interventions, not presenting previous medical data, which made it difficult for us to identify their type of cleft.

We investigated the risk factors for OFCs, such as familial recurrence, parental consanguinity, exposure to teratogenic agents, parental age and maternal diseases. The etiologic factors were obtained based on the patients' clinical data, medical histories and exam results, according to the needs of each patient. We also analyzed the time of diagnosis, age when beginning the specialized treatment, access to surgical treatment and support therapies.

For laboratorial genetic analysis, we collected 15mL of peripheral blood of patients in tubes containing heparin or EDTA. Depending on the indication, the sample with heparin was used for GTG-band karyotyping and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), which were performed by following the routine protocol of the Genetics Laboratory (HB/FUNFARME). EDTA samples were used in molecular studies and sent to DNA Biorrepository of Individuals with OFCs in the coordinating center (UNICAMP/Campinas). Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification (MLPA) and Array Comparative Genomic Hybridization (a-CGH) were performed in some individuals based on diagnostic hypotheses and on manufacturers' protocol.

The results were presented in absolute numbers (n) and frequencies (%). We performed exploratory data analyses through summary measures (mean, standard deviation, minimum, median, maximum, frequency and percentage) and the differences between variables were tested by χ^2 analysis or Fisher's exact test. All statistical analyses were performed with the SAS System for Windows (Statistical Analysis System, version 9.4, SAS Institute Inc.). All tests were calculated with a 95% CI and significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 70 individuals participated in the study; 40% of them lived in São José do Rio Preto, in the state of São Paulo, while 60% of them lived in other cities (60%) of the region (Figure 1).

Thirty eight participants informed their family income (Table 1), which we measured in minimum wages (MW). The average family income was of 2.07 MW per month — about US\$536.62 (mode of 01 MW; median of 02 MW), corresponding to lower middle class.

We obtained information on ethnic ancestry from 53 mothers and 48 fathers. A total of 40 (75.47%) mothers and 33 (68.75%) fathers have self-declared their native ancestry (Latin European + African + Indigenous). Therefore, most patients were native descent.

In 57 cases, it was possible to identify the type of OFCs. Table 2 presents type distribution by sex, laterality, etiology and familial recurrence.

There was a significant difference (p -value: 0.0379) in the type of clefts regarding sex. Males were more affected (32; 56.10%) by it and presented more CLP while women presented more CP. There was no significant difference between bilateral and unilateral, right and left. Most of the affected individuals were syndromic (p -value: 0.0201) and did not present familial recurrence.

From 70 subjects, 48 (68.57%) were syndromic and 22 (31.43%) were non-syndromic. We identified etiological diagnoses in 26 (54.16%) of syndromic cases. The genetic causes were more frequent, with predominance of 22q11.2 deletion syndrome (38.89%) (Table 3).

Among those with multiple BDs, five diagnostic hypotheses still needed confirmation: Noonan Syndrome, Optiz G/BBB Syndrome, Dubowitz Syndrome, Craniofrontonasal Syndrome and Ischiocoxopodopatellar syndrome.

We performed laboratory genetic tests based on the diagnostic hypothesis raised in each case and the standardized routine of service.

We observed possible OFCs risk factors in both groups. The frequencies observed in syndromic and non-syndromic are in Table 4. When comparing syndromic and non-syndromic (sporadic cases) patients, male and female patients were equally affected among syndromics, while males were mostly affected among sporadic cases. We observed the presence of advanced age and parental consanguinity in the same number of cases between the groups. In addition, there was no significant difference between groups regarding the exposure to teratogenic agents, the total number of pregnancies, gestational age and maternal disease. Familial

recurrence was the only risk factor that significantly differed between the groups, being more significantly frequent in non-syndromic subjects (p -value: 0.0362).

There was no significant difference between the two groups regarding the time of diagnosis, age when beginning specialized treatment, first surgical correction of OFCs and access to speech therapy (Table 5). All the cases of CP from both groups received diagnosis in the postnatal period. Regarding CLP, most syndromic cases (70.00%) received diagnosis during the prenatal period, while isolated cases (66.67%) received it in the postnatal period.

Most syndromic and non-syndromic patients underwent specialized treatment with ≤ 1 month; we verified that 24.40% of cases have started treatment with ≥ 24 months of life. From the 57 cases that could present clefts, 12 (21.05%) did not undergo surgical correction before two years of age.

The average age of the first surgical intervention in CL syndromic cases was of 10.33 months and of 11 months in non-syndromic ones. The average age for surgical correction of CP syndromics was of 18 months, and of 39 months for non-syndromic. When considering individuals with CLP from both groups, the average age was of 21.81 months for CL correction, and of 110.38 months for CP. Within this series, two adolescents still have not undergone CLP corrective surgeries.

Among the reasons that prevented surgical intervention, there were: low weight at the indicated time of the surgical procedure, lack of referral to specialized centers, long waiting list in the public referral hospital, and address change without data updating in the hospital, which prevented contact.

Most patients had access to support therapy, especially speech therapy, indicated for all cases. However, 31.70% of patients had no access to this modality of treatment. There was a significant difference between syndromic and non-syndromic patients regarding access to physiotherapy, occupational therapy, ecotherapy and hydrotherapy (p -value: 0.0053).

DISCUSSION

Most subjects were from São José do Rio Preto and its surroundings, assuming the city holds a center of excellence for treatment of patients who need complex and highly specialized procedures covered by the Brazilian public health care system. Furthermore, Hospital de Base has the only Genetics Service in the region, which attract individuals with OFCs from the Southeastern Region of the country (Hospital de Base, 2018).

Our results on family income, measured in minimum wages, revealed the predominance of less favored socioeconomic classes. We did not obtain this data from all individuals from the

sample, because only the later stages of BDCA implementation considered it. There are controversies in the literature on the correlation between socioeconomic factors and orofacial clefts due to the methodological diversity found in different study models (Deguen et al., 2016). Some studies have shown that most OFCs cases occur in children living in low socioeconomic conditions (Rodrigues et al., 2009). However, this alleged correlation does not necessarily imply the socioeconomic status is an isolate risk factor for craniofacial anomalies, but it certainly favors greater exposure to other risk factors, such as nutritional health, or a greater difficulty of access to health, contributing to the exposure to other risk factors, such as maternal-fetal diseases. In fact, it is also possible to explain the predominance of economically disadvantaged families considering that they attended a university hospital where patients use the Brazilian unified public health care system (SUS).

Ethnicity is a risk factor for orofacial clefts. Palate clefts, for example, are more frequent in Asian ethnicity (Burg et al., 2016). The data obtained during the interview on the ethnic ancestry of the parents of patients showed that most of them were native descent, which according to the criteria used by the BDAC, is a miscegenation among people of Latin American, African and Indigenous origin. One can justify these findings through the intense Brazilian miscegenation composed of different ethnic groups in its phenotype. Even after centuries, the traces of colonization remain intact in the genome of the Brazilian population. Levels of miscegenation may vary by region, but Brazil is a mixed country, the most common mixing being between Afro-Brazilians and Caucasians (EPIGEN-Brazil, 2018).

The lower the miscegenation, the more easily we can relate an individual's genome to a preponderant ethnicity. However, when the level of miscegenation is very high, as in our sample, these associations become less defined and the influence of ancestry in the incidence of OFCs becomes more difficult to identify. The relative contribution of individual susceptibility genes may vary in different populations. Studies on linkage analyses and genome association have already identified several regions of genomic susceptibility for OFCs, especially in populations of European and Asian origin. In addition, in Brazil some gene polymorphisms showed positive associations between OFCs and population with greater African ancestry (Rego Borges et al., 2015).

Sex-dependent susceptibility of clefts is lacks elucidation. Blanco et al. (2001) proposed that male susceptibility to CL and CLP may be associated with a *MSX1* gene variation mapped on chromosome 4 to a certain extent. On other hand, the association of CP with female sex may be associated with embryo closure time of the secondary palate, which occurs later in women

than in men (Souza and Raskin, 2013). However, recent genome-wide interaction studies identified sex-specific risk alleles for nonsyndromic orofacial clefts (Carlson et al., 2018).

Considering the types of OFCs, there was a predominance of CLP, a discrete predominance of unilateral clefts over bilateral clefts, greater impairment of the left side when compared to the right one, a statistical association between CLP and male gender and between CP and female gender. In addition, individuals with CLP showed bilateral impairment more frequently than those with CL. These findings corroborate with those previously described in the literature (Monlleó et al., 2015; Alfwaress et al., 2017).

Groups of genes asymmetrically expressed during the onset of embryogenesis may explain the greater impairment of the left side when compared to the right side, but no studies have proven this hypothesis yet. Moreover, as CL and CLP are pathogenetically distinct, researchers should analyze them separately (Monlleó et al., 2015). One can justify the wide frequency variation between subgroups by sample size and the methodological differences between the studies.

About 70% of the cases of orofacial clefts are non-syndromic, while the 30% remaining ones stem from Mendelian inheritance, chromosomal alterations and teratogenic conditions. In addition, most cases of OFCs are isolate, while in syndromic cases it is possible to observe greater association with CP (Monlleó et al., 2015; Woo, 2017). In our study, there was a predominance of syndromic individuals and statistical association with CP. BDAC criteria and the sample origin can justify this higher frequency of syndromic cases, which mostly come from a Genetics Service.

Regarding the non-syndromic OFCs identified in 22 of our patients, there are studies aimed at detecting candidate genes to trigger such conditions, considered multifactorial in most cases. Hoebel et al. (2017), through exome sequencing, identified some genes related to non-syndromic OFCs, mainly CP; some of them were *ACACB*, *PTPRS* and *MIB1*, which regulate different biological pathways, but the authors themselves pointed out that further studies are necessary given the genetic complexity of OFCs.

In the case of patients with syndromic OFCs, many of them showed different conditions with a clarified genetic etiology, whose phenotypic spectrum includes the presence of OFCs (such as Fanconi syndrome, Van der Woude syndrome and Branchio-oculo-facial syndrome). Other cases presented conditions of multifactorial etiology, such as Moebius syndrome and Pierre-Robin, while some presented OFCs with etiology attributed to environmental factors, such as disruption by maternal diabetes and amniotic band syndrome. The most frequent genetic

etiology was the 22q11.2 deletion syndrome and the most common for environmental etiology was the Fetal Alcohol Syndrome.

Studies mention the presence of OFCs in several gene and chromosomal disorders (Burg et al., 2016; OMIM, 2018). Despite the effect of several genetic alterations translating into peculiar phenotypes known for their signs and symptoms that enable clinical diagnosis, while others cases are harder to diagnose. There is need to identify the cleft-causing mutations in all patients of a sample, requiring several high cost molecular tests, which we did not perform in this study due to financial limitations. Diagnoses based on clinical examination reinforce the importance of genetic evaluation by a specialized professional and the genetic outpatient follow-up of patients with OFCs. However, this is not always enough. In our study, nine cases of normal karyotype had no diagnosis of specific affections, had no diagnosis of specific affections, despite the presence of multiple BDs, reinforcing the importance of carrying out genetic tests of greater specificity when studying OFCs without etiological diagnosis. However, it is worth to highlight that in countries with poor investments to health, such as Brazil, the population's access to high-cost exams is highly limited, even in centers of reference (Monlleó et al., 2015).

The obtainment of karyotype, FISH and a-CGH, considering the genetic criteria of indication in each case may result in the etiological clarification of many cases, as we did. For example, the genetic causes were more frequent in our study, with predominance of the Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (SD22q11.2), as expected considering it is the most common microdeletion syndrome, being most frequently associated with CP. It results from hemizygous deletion of chromosome 22q11.2 and is the CNV most frequently associated with OFCs, affecting both men and women equally (Repetto et al., 2014; Vangkilde et al., 2016; Lin et al., 2017). This alteration was the most frequent one in our study, and the 5:2 proportion of affected women and men may have been casual, considering the reduced casuistic size.

In this study, alcohol consumption was the most frequently observed environmental risk factor for OFCs. The effect of alcohol consumption during pregnancy can result in Fetal Alcohol Syndrome (FAS), affecting approximately 33% of children born from mothers who consumed more than 150g of ethanol per day, the equivalent of a cup of tea. This syndrome interferes negatively in the proper development of the fetus and may lead to orofacial clefts, retardation of intrauterine growth, cardiac malformations, reduction of intellectual capacity, alterations in motor coordination, among others (Oliveira and Simões, 2007). Research indicates alcohol consumption during pregnancy is common when the mother does not know about her pregnancy, especially when she was not planning to get pregnant (Oliveira and Simões, 2007;

Silva et al., 2018). In developing countries, including Brazil, there are still few studies on the teratogenic risks of alcohol consumption in the gestational period. Alcohol consumption during pregnancy is often underdiagnosed due to maternal omission, driven by guilt and fear of a possible disapproval by the health professional, and difficulty of access to health services even in the gestational period (Rocha et al. al., 2013). In some cases, alcohol consumption is associated with the lack of information and awareness on alcohol misuse and false beliefs (Freire et al., 2009). Consuming alcohol, tobacco and using drugs during the gestational period requires medical attention and educational health actions to raise awareness of the risks of such practices (Wehby et al., 2017; Silva et al., 2018).

Other risk factors include advanced paternal age (≥ 40 years) and advanced maternal age (≥ 35 years), maternal smoking, poor nutrition, metabolic status (diabetes and obesity), exposure to other teratogens, such as solvents, agricultural products, medicine and illicit drugs during the gestational period (Martelli et al., 2015), which we observed in our sample.

Advanced maternal age is a risk factor to isolated BDs, including OFCs, due to anomalies resulting from numerical chromosomal changes. Advanced paternal age also increases the risk of children with OFCs, especially CP (Herkrath et al., 2012; Burg et al., 2016).

Some studies associate maternal diseases with the etiology of OFCs, especially with gestational diabetes. Diabetes is as an etiological factor for several congenital anomalies, including CLP (Martelli et al., 2015). However, there is need for further investigation on this relationship, as other studies have not related this disease to the occurrence of OFCs (Kostrisch, 2016). Maternal obesity has also been considered a risk factor for OFCs, mainly CP. Despite its mechanism of action still being unknown, it might stem from nutritional deficiencies or changes in glycemic control, similarly to what occurs in diabetic mothers (Burg et al., 2016).

We observed advanced age and parental consanguinity in the same frequency in our syndromic and non-syndromic studied cases and the total number of pregnancies did not show significant differences between them. However, familial recurrence was the only risk factor that differed significantly between the groups, being more frequent among non-syndromic subjects. With the exception of two cases, all of our syndromic patients were sporadic in their genealogies, which may explain this result.

Parental consanguinity and familial recurrence are risk factors that called the attention of professionals because of the genetic component in the etiology of OFCs and the risk of recurrence when compared to the background population in first and third degree relatives (Gilda-Silva-Lopes and Monlleó, 2014). Although most CL/P cases are sporadic within a family, a positive family history occurs in about 26% of cases. The chance of the child with CL/P's

sibling also being affected is about 30–40 times higher than the risk for the general population (of approximately 0.1%). The risk for siblings born from unaffected parents increases about 4% after an affected child, and to up to 10% after two affected children. If one parent is affected, the risk of having other affected children after an affected child is of about 10%. The risk of recurrence for first, second and third degree relatives is 4%, 0.7% and 0.3%, respectively. In the cases of twins, the concordance index in monozygotic is 33% and of 7% in dizygotic twins. In addition, children born from consanguineous couples present higher risk of occurrence (Burg et al., 2016; Silva et al., 2018).

The identification of risk factors can greatly assist in the Genetic Counseling of families. Besides, the recognition of etiology, risk factors and natural history is fundamental to define prevention, treatment planning and surgical intervention (Silva et al., 2018).

The surgery is an essential step for the rehabilitation of individuals with OFCs. There is need for specialized, multidisciplinary, long-lasting treatment with surgical intervention at the appropriate and indicated times. WHO proposes care by a multidisciplinary and highly specialized team, included on genetic evaluation. However, only a few specialized centers offer this service, accounting for 28 all over the Brazilian territory (CNES, 2018), a low number considering the country's populational demand. In addition, not every center has the material and human resources, and not all patients have access to these centers, which indicate the need for change in health policies (Monlleó et al., 2015).

On the other side, many of our patients were born without prenatal diagnosis, which raises doubts, causes anxiety and scare parents. Amstalden-Mendes et al (2011) believe it is fundamental to provide perinatal and postnatal counseling to parents to clarify all of these issues and to promote the access to relevant information and treatments.

There are different surgical protocols (Gatti et al., 2017), however, lip correction and closure surgery are know for occurring from 3 to 6 months of age and palate correction from 9 to 12 months, if possible not exceeding 18 months of age (Miachon and Leme, 2014; Ise et al., 2018). At these ages, anesthesia is safer, the repair is more accurate, and parents are more prone to accept malformations. The ideal protocol has to ensure facial growth and speech development (Silva et al., 2018).

In this study, the average age of the first surgical intervencion, in all kinds of typical OFCs, was higher than that recommended by different surgical protocols. This delay can indicate the precarious access to surgical treatment and inadequate planning of treatment even in reference hospitals. Our data corroborate to those recently observed by Ise et al. (2018), which associate diagnosis and treatment delays to patients receiving delayed primary repairs.

In contrast, they may also represent not only a lack of access to available services, but to patients' lack of awareness on the importance of early treatments and the lack of public policies focused on case identification and referral to specialized services.

The postponement and the delay of treatments promote the increase of morbidity and impairment of the individual's development, such as difficulties to eat, speak, and listen, psychological problems, and even social exclusion (Silva et al., 2018). In some cases, patient's insufficient sucking and the ingestion of insufficient amounts of food do not guarantee the meeting of the individual's nutritional needs and do not promote caloric superavit for weight gain, thus not allowing the patient to perform surgical correction at the appropriate time (Amstalden-Mendes et al., 2011).

Many of our patients also had no access to speech therapy or other types of supportive therapy. One can explain the significant difference between syndromic and non-syndromic patients regarding the access to physiotherapy, occupational therapy, equine therapy and hydrotherapy by syndromic patients' additional needs.

Individuals with OFCs are prone to various comorbidities, such as recurrent otitis, pneumonia, speech delay, otologic and/or auditory disorders. Speech therapy is essential as it decreases oral communication impairment and speech delay, common conditions among patients. In some cases, depending on the severity of the patient's condition, and usually being more associated with the syndromic group, individuals can undergo other forms of therapy, such as hydrotherapy, occupational therapy and psychotherapy, all aimed at further stimulating and ensuring adequate neuropsychomotor development (Alfwaress et al. 2017; Rando et al., 2018).

Typical oral clefts require efforts at all health levels due to its high prevalence, and its association with various congenital defects, comorbidities, and the need for long-term treatments. Trained care is essential for these individuals. However, previous Brazilian studies indicate that health professionals's knowledge on OFCs is relatively low; many of them evaluate themselves as not capable to perform the routine follow-ups of an individual with OFCs even in their own area of specialization (Amstalden-Mendes et al., 2007; Gil-da-Silva-Lopes and Monlleó, 2014).

CONCLUSIONS

Most of the results corroborate those previously described in the literature. Studying epidemiological characteristics and possible etiological factors in individuals with syndromic and non-syndromic OFCs in the BDAC/SJRP/CranFlow[®] shows that sex, native ancestry and

low family income represented risk factors in the investigated cases. The etiological factors are diverse and complex, focusing on the high frequency of genetic disorders, specially the 22q deletion syndrome. There is a lack of information on orofacial clefts, which leads to delays in diagnosis and treatment. Using a database may be good strategy to identify the important characteristics of patients with these defects. Recognizing the epidemiological and etiological characteristics, the risk factors and the ease of access to specific treatments by individuals with OFCs is essential to understand the patients' reality, to promote adequate health care and public policies aimed at overcoming inequities. Education policies for the population and the training of health professionals should be emphasized as a priority.

Conflict of interest: The authors declare that there were no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abreu MHNG, Lee KH, Luquetti DV, Starr JR. Temporal trend in the reported birth prevalence of cleft lip and/or cleft palate in Brazil, 2000 to 2013: Time Trend of Cleft Lip and Cleft Palate. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2016;106(9):789-792.
- Alfwaress FSD, Khwaileh FA, Rawashdeh MA, Alomari MA, Nazzal MS. Cleft Lip and Palate: Demographic Patterns and the Associated Communication Disorders. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2017;28(8):2117-2121.
- Amstalden-Mendes LG, Magna LA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Neonatal Care of Infants with Cleft Lip and/or Palate: Feeding Orientation and Evolution of Weight Gain in a Nonspecialized Brazilian Hospital. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2007;44(3):329-334.
- Amstalden-Mendes LG, Xavier AC, Antunes DK, Ferreira ACRG, Tonocchi R, Fett-Conte AC, Silva RN, Leirião VHV, Caramori LPC, Magna LA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Time of diagnosis of oral clefts: a multicenter study. *Jornal de Pediatria*. 2011;0(0).
- Beaty TH, Marazita ML, Leslie EJ. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. *F1000Research*. 2016;5:2800.
- Bilińska M, Osmola K. Cleft lip and palate--risk factors, prenatal diagnosis, and health consequences. *Ginek Pol*. 2015;86(11):862-866.
- Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L, Palomino H, Schull WJ. Evidence of a Sex-Dependent Association between the MSX1 Locus and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Chilean Population. *Human Biology*. 2001;73(1):81-89.

- Blencowe H, Moorthie S, Darlison MW, Gibbons S, Modell B. Methods to estimate access to care and the effect of interventions on the outcomes of congenital disorders. *Journal of Community Genetics*. 2018;9(4):363-376.
- Burg ML, Chai Y, Yao CA, Magee W, Figueiredo JC. Epidemiology, Etiology, and Treatment of Isolated Cleft Palate. *Front Physiol*. 2016;7:67.
- Carlson JC, Nidey NL, Butali A, Buxo CJ, Christensen K, Deleyiannis FW-D, Hecht JT, Field LL, Moreno-Urbe LM, Orioli IM, et al. Genome-wide interaction studies identify sex-specific risk alleles for nonsyndromic orofacial clefts. *Genetic Epidemiology*. 2018;42(7):664-672.
- CNES. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. Available at: http://cnes2.datasus.gov.br/Mod_Ind_Habilitacoes_Listar.asp?VTipo=0401&VListar=1&VEstado=00&VMun=&VComp=&VContador=28&VTitulo=H. Accessed October 6, 2018.
- Deguen S, Kihal W, Jeanjean M, Padilla C, Zmirou-Navier D. Neighborhood Deprivation and Risk of Congenital Heart Defects, Neural Tube Defects and Orofacial Clefts: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One*. 2016;11(10):e0159039.
- EPIGEN-Brasil. Available at: <https://epigen.grude.ufmg.br/>. Accessed October 2, 2018.
- Freire K, Padilha PC, Saunders C. Factors associated to alcohol and smoking use in pregnancy. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2009;31(7):335-341.
- Gatti GL, Freda N, Giacomina A, Montemagni M, Sisti A. Cleft Lip and Palate Repair. *J Craniofac Surg*. 2017;28(8):1918-1924.
- Gil-da-Silva-Lopes VL, Monlleó IL. Risk factors and the prevention of oral clefts. *Brazilian Oral Research*. 2014;28(spe):1-5.
- Herkraht APC de Q, Herkraht FJ, Rebelo MAB, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent*. 2012;40(1):3-14.
- Hoebel AK, Drichel D, van de Vorst M, Böhmer AC, Sivalingam S, Ishorst N, Klamt J, Gözl L, Alblas M, Maaser A, et al. Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Palate Detected by Exome Sequencing. *J Dent Res*. 2017;96(11):1314-1321.
- Hospital de Base - São José do Rio Preto. Available at: <http://www.hospitaldebase.com.br/index>. Accessed October 2, 2018.
- Human Phenotype Ontology. Available at: <https://hpo.jax.org/app/>. Accessed October 2, 2018.
- International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research. Available at: <http://www.icbdsr.org/>. Accessed October 2, 2018.

- Ise A, Menezes C, Batista Neto J, Saluja S, Amundson JR, Jenny H, Massenburg B, Citron I, Alonso N. Patient-Perceived Barriers to Accessing Cleft Care at a Tertiary Referral Center in São Paulo, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J*. August 2018;1055665618796018.
- Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, Reese SE, Markunas CA, Richmond RC, Xu C-J, et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;98(4):680-696.
- Kostrisck LMV. Contribuição dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene da melatonina para ocorrência de diabetes mellitus gestacional e fissuras labiopalatinas. Bauru, University of São Paulo; 2016. *Thesis*.
- Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C(4):246-258.
- Lin A, Ching CRK, Vajdi A, Sun D, Jonas RK, Jalbrzikowski M, Kushan-Wells L, Pacheco Hansen L, Krikorian E, Gutman B, et al. Mapping 22q11.2 Gene Dosage Effects on Brain Morphometry. *The Journal of Neuroscience*. 2017;37(26):6183-6199.
- Martelli DRB, Coletta RD, Oliveira EA, Swerts MSO, Rodrigues LAM, Oliveira MC, Martelli-Júnior H. Association between maternal smoking, gender, and cleft lip and palate. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2015;81(5):514-519.
- Miachon MD, Leme PLS. Surgical treatment of cleft lip. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*. 2014;41(3):208-214.
- Monlleó IL, Fontes MÍB, Ribeiro EM, Souza J, Leal GF, Félix TM, Fett-Conte AC, Bueno BH, Magna LA, Mossey PA, Gil-da Silva-Lopes VL. Implementing the Brazilian Database on Orofacial Clefts. *Plastic Surgery International*. 2013;2013:1-10.
- Monlleó IL, Barros AGR, Fontes MIB, Andrade AKM, M. Brito G, Nascimento DLL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Diagnostic implications of associated defects in patients with typical orofacial clefts. *Jornal de Pediatria*. 2015;91(5):485-492.
- Oliveira TR, Simões SMF. O consumo de bebida alcoólica pelas gestantes: um estudo exploratório. *Escola Anna Nery*. 2007;11(4):632-638.
- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Available at: <http://omim.org/>. Accessed October 2, 2018.
- Projeto Crânio-Face Brasil | Faculdade de Ciências Médicas. Available at: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>. Accessed October 23, 2018.
- Rando GM, Jorge PK, Vitor LLR, Carrara CFC, Soares S, Silva TC, Rios D, Machado MAAM, Gavião MB, Oliveira TM. Oral health-related quality of life of children with oral clefts and their families. *Journal of Applied Oral Science*. 2018;26(0).

- Rego Borges A, Sá J, Hoshi R, Viena CS, Mariano LC, Castro Veiga P, Medrado AP, Machado RA, Aquino SN, Messetti AC, et al. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(10):2344-2349.
- Repetto GM, Guzmán ML, Delgado I, Loyola H, Palomares M, Lay-Son G, Vial C, Benavides F, Espinoza K, Alvarez P. Case fatality rate and associated factors in patients with 22q11 microdeletion syndrome: a retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2014;4(11):e005041.
- Rocha RS, Bezerra SC, Lima JWO, Costa FS. Consumo de medicamentos, álcool e fumo na gestação e avaliação dos riscos teratogênicos. *Rev Gaúcha Enferm*. 2013;34(2):37-45.
- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli ÂG, Ferreira MÂF. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Brazilian Oral Research*. 2009;23(1):38-42.
- Silva HPV, Arruda TTS, Souza KSC, Bezerra JF, Leite GCP, Brito MEF, Lima VMGDM, Luchessi AD, Bortolin RH, Ururahy MAG, et al. Risk factors and comorbidities in Brazilian patients with orofacial clefts. *Brazilian Oral Research*. 2018;32:e24.
- Sousa GFT de, Roncalli AG. Orofacial clefts in Brazil and surgical rehabilitation under the Brazilian National Health System. *Brazilian Oral Research*. 2017;31(0).
- Souza J, Raskin S. Clinical and epidemiological study of orofacial clefts. *Jornal de Pediatria*. 2013;89(2):137-144.
- Vangkilde A, Jepsen JRM, Schmock H, Olesen C, Arnarsdóttir S, Baaré WFC, Plessen KJ, Didriksen M, Siebner HR, Werge T, Olsen L. Associations between social cognition, skills, and function and subclinical negative and positive symptoms in 22q11.2 deletion syndrome. *J Neurodev Disord*. 2016;8:42.
- Volpe-Aquino RM, Monlleó IL, Lustosa-Mendes E, Mora AF, Fett-Conte AC, Félix TM, Xavier AC, Tonocchi R, Ribeiro EM, Pereira R, et al. CranFlow: An Application for Record-Taking and Management Through the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies: CranFlow and BDCA. *Birth Defects Research*. 2018;110(1):72-80.
- Wehby GL, Uribe LMM, Wilcox AJ, Christensen K, Romitti PA, Munger RG, Lie RT. Interaction between smoking and body mass index and risk of oral clefts. *Annals of Epidemiology*. 2017;27(2):103-107.
- Woo AS. Evidence-Based Medicine: Cleft Palate. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2017;139(1):191e-203e.
- WHO. WHO Anthro (version 3.2.2, January 2011) and macros. Available at: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>. Accessed October 2, 2018.

LIST OF FIGURES

FIGURE 1 Map of the state of São Paulo highlighting the region of São José do Rio Preto containing the main cities where the individuals under study live. The size of the circle is proportional to the number of cases in the local

LIST OF TABLES

TABLE 1 Distribution of individuals per family income

TABLE 2 Distribution of individuals with oral cleft according to the types of oral clefts defined by sex, laterality, classification and familial recurrence

TABLE 3 Number of syndromic cases from diagnosis, etiology and diagnostic evidence

TABLE 4 Frequency of risk factors in syndromic and non-syndromic groups

TABLE 5 Time of diagnosis and health access variables in syndromic and non-syndromic groups

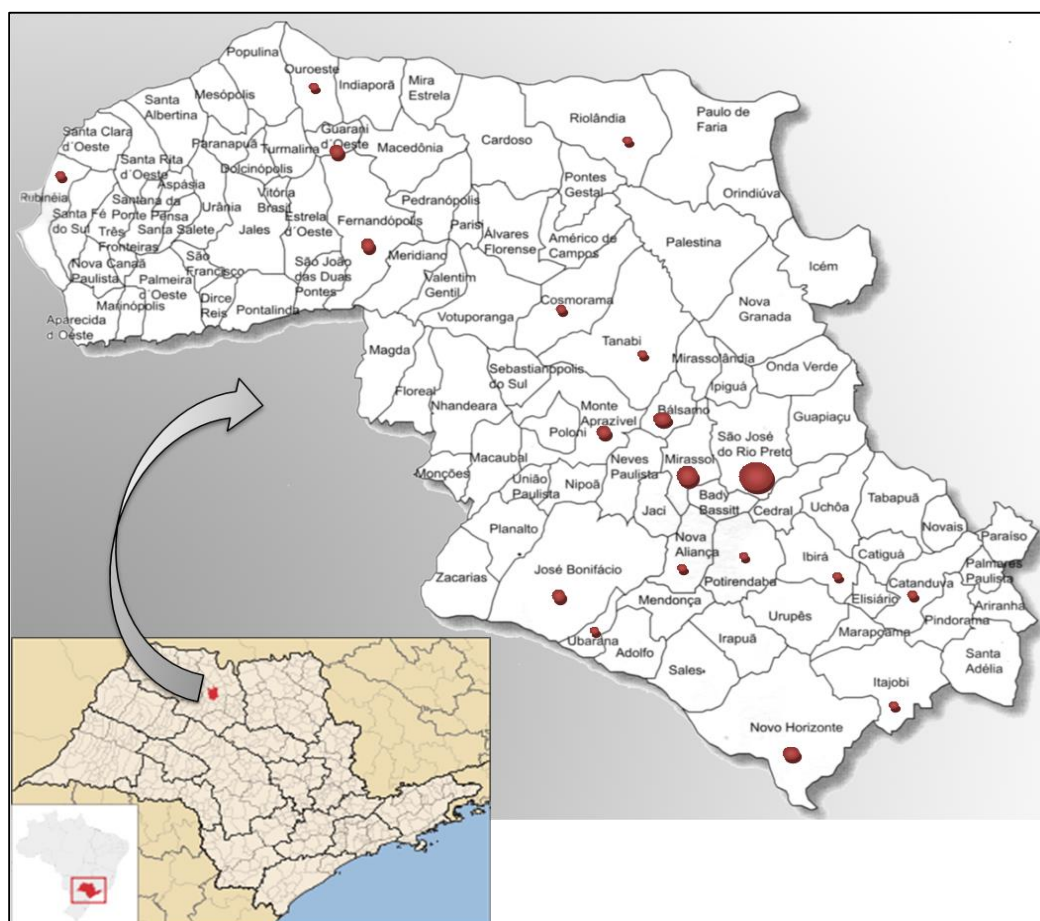


FIGURE 1 Map of the state of São Paulo highlighting the region of São José do Rio Preto containing the main cities where the individuals under study live. The size of the circle is proportional to the number of cases in the local.

TABLE 1 Distribution of individuals per family income

Number of families	MW	Frequency (%)
14	01	36.84
02	1.5	5.26
12	02	31.58
01	2.5	2.63
03	03	7.90
04	04	10.53
02	05	5.26

MW = minimum wages.

TABLE 2 Distribution of individuals with oral cleft according to the types of oral clefts defined by gender, laterality, classification and familial recurrence

Variable	Category	CL n (%)	CP n (%)	CLP n (%)	Total n (%)	p-value
Sex (n:57)	Female	4 (50.00)	13 (65.00)	8 (27.60)	25 (43.90)	0.0379 ¹
	Male	4 (50.00)	7 (35.00)	21 (72.40)	32 (56.10)	
Laterality (n:37)	Unilateral - Right	3 (37.50)	-	6 (20.70)	9 (24.40)	0.3483 ¹
	Unilateral - Left	3 (37.50)	-	8 (27.60)	11 (29.70)	
	Bilateral	2 (25.00)	-	15 (51.70)	17 (45.9%)	
Classification (n:57)	Non-syndromic	2 (10.00)	3 (15.00)	15 (75.00)	20 (35.10)	0.0201 ¹
	Syndromic	6 (16.20)	17 (45.90)	14 (37.80)	37 (64.90)	
Familial Recurrence (n:41)	Yes	3 (37.50)	3 (30.00)	11 (47.80)	17 (41.50)	0.6925 ¹
	No	5 (62.50)	7 (70.00)	12 (52.20)	24 (58.50)	

CL = cleft lip; CP = cleft palate; CLP = cleft lip with cleft palate; p -value¹ = Fisher's exact test.

TABLE 3 Number of syndromic cases from diagnosis, etiology and diagnostic evidence

Diagnosis/Etiology	N	Diagnostic evidence
MBDs/unknown	09	Clinical
Chromosome 22q11.2 deletion syndrome/genetic	07	FISH e MLPA
Fetal alcohol syndrome/environmental	03	Clinical
Complex chromosomal rearrangement/genetic	02	Karyotype
Amniotic band syndrome/environmental	01	Clinical
Adams-Oliver Syndrome/genetic	01	Clinical
Branchio-Oculo-Facial syndrome (BOFS)/genetic	01	Clinical
Chromosome 3p26.1 deletion/genetic	01	a-CGH
Chromosome 16p11.2 deletion syndrome/genetic	01	a-CGH
Disruption by maternal diabetes/environmental	01	Clinical
EEC syndrome/genetic	01	Clinical
Fanconi syndrome/genetic	01	Clinical and DEB
Moebius syndrome/multifactorial	01	Clinical
Pierre-Robin syndrome/multifactorial	01	Clinical
Orofaciodigital Syndrome type 1/genetic	01	Clinical
Van der Woude syndrome/genetic	01	Clinical
Wolf-Hirschhorn syndrome (4p-)/genetic	01	Karyotype and FISH

N = number of individuals; CL = cleft lip; CP = cleft palate; CLP = cleft lip with cleft palate; MBDs = multiple birth defects; FISH = Fluorescence In Situ Hybridization; MLPA = Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification; DEB = diepoxybutane; a-CGH = Array-Comparative Genomic Hybridization.

TABLE 4 Frequencies of risk factors in syndromic and non-syndromic groups

Risk Factor	Categor y	Syndromic n (%)	Non-syndromic n (%)	p-value
Sex (n:70)	Female	24 (50.00)	8 (36.40)	0.2877 ²
	Male	24 (50.00)	14 (63.60)	
Paternal age at birth (n:51)	≥ 40	4 (12.10)	4 (22.20)	0.4297 ¹
Maternal age at birth (n:56)	≥ 35	3 (8.10)	3 (15.80)	0.3971 ¹
Consanguinity (n:62)		1 (2.40)	1 (4.80)	-
Alcohol (n:59)		8 (21.60)	1 (4.50)	0.1337 ¹
Tobacco (n:59)		6 (16.20)	3 (13.60)	1.0000 ¹
Illicit drugs (n:59)		2 (5.40)	0 (0.00)	-
Exposure to other teratogens (n:54)		14 (41.20)	7 (35)	0.6530 ²
Total number of pregnancies (n:69)	1	15 (31.30)	5 (23.80)	0.5176 ¹
	2 to 4	30 (62.50)	13 (61.90)	
	≥ 5	3 (6.30)	3 (14.30)	
Gestational age (n:43)	Term	16 (66.70)	14 (73.70)	0.6188 ²
	Preterm	8 (33.30)	5 (26.30)	
Maternal disease (n:59)	Diabetes	2 (5.30)	3 (14.30)	0.3365 ¹
	Epilepsy	1 (2.60)	1 (4.80)	-
	Obesity	0	2 (9.50)	-
	Others	7 (18.40)	2 (9.50)	0.4687 ¹
Familial recurrence (n:45)		7 (26.90)	11 (57.90)	0.0362 ²

p -value¹ = Fisher's exact; p -value² = Chi-square

TABLE 5 Time of diagnosis and health access variables in syndromic and non-syndromic groups

Variable	Category	Specification	Syndromic n (%)	Non- syndromic n (%)	p-value
Time of diagnosis (n: 37)	CL	Prenatal	2 (40.00)	-	-
		Postnatal	3 (60.00)	2 (100)	
	CP	Prenatal	-	-	-
		Postnatal	6 (100)	2 (100)	
	CLP	Prenatal	7 (70.00)	4 (33.33)	0.0868 ²
		Postnatal	3 (30.00)	8 (66.67)	
Age of beginning specialized treatment (n: 41)	No		1 (3.30)	0	-
	≤ 1 month		15 (50.00)	5 (45.50)	
	≤ 12 months		6 (20.00)	0	
	13-23 months		0	1 (9.10)	
	≥ 24 months		5 (16.70)	5 (45.50)	
Access to first surgery	CL (n: 8)	Yes	3 (60.00)	2 (100)	-
		No	2 (40.00)	-	
	CP (n: 20)	Yes	2 (33.33)	2 (100)	-
		No	4 (66.67)	-	
	CLP (n: 29)	Lip correction	5 (50.00)	4 (33,33)	0.5681 ¹
		Palate correction	-	-	
		Both	2 (20.00)	5 (41.67)	
		No	3 (30.00)	3 (25.00)	
Supportive therapy	Speech therapy (n:41)	Yes	19 (76.00)	9 (56.30)	0.1849 ²
		No	6 (24.00)	7 (43.80)	
	Others* (n:41)	Yes	14 (56.00)	2 (12.50)	0.0053 ²
		No	11(44.00)	14 (87.50)	

*Physiotherapy, Occupational Therapy, Ecotherapy and Hydrotherapy; $p\text{-value}^1$ = Fisher's exact; $p\text{-value}^2$ = Chi-square.

DELEÇÃO EM 3p26.1 ENVOLVENDO O GENE *GRM7* ASSOCIADA COM FENDA ORAL E ALTERAÇÕES DE COMPORTAMENTO

Marina Cristine Cano Francisquetti¹, Táris Antônio Paiva Vieira², Matheus de Mello Copelli², Ilária Cristina Scardioli², Gabriela Moreira de Freitas³, Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes², Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo (Unesp). São José do Rio Preto, SP, Brasil.
2. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil.
3. Psicóloga, Hospital de Base. São José do Rio Preto, SP. Brasil.
4. Departamento de Biologia Molecular, Serviço de Genética, Hospital de Base, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME). São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para Correspondência:

Marina Cristine Cano Francisquetti

Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (Unesp)
São José do Rio Preto

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth - CEP 15.054-000

São José do Rio Preto-SP, Brazil

Phone: 55+17+3210 5000, 1931. E-mail: mafrancisquettibio@gmail.com.

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

RESUMO

O *GRM7*, gene que codifica o receptor metabotrópico do glutamato 7 (mGluR7), está relacionado com sinalização excitatória de neurotransmissores sinápticos e plasticidade do cérebro dos mamíferos. Polimorfismos nesse gene têm sido associados com múltiplos distúrbios neuropsiquiátricos e predisposição à adicção a drogas. Neste trabalho relatamos uma menina com 15 anos de idade, aparência facial atípica, fenda palatal submucosa, insuficiência velofaríngea e alterações neuropsiquiátricas, selecionada a partir de casos suspeitos de apresentar Síndrome de deleção 22q11.2, sem a deleção confirmada por teste molecular. A técnica de Análise Cromossômica por *microarray* (ACM) detectou uma deleção de 606 kb em 3p26.1 envolvendo quase toda a extensão do gene *GRM7*. Essa deleção foi herdada do seu pai, com fenótipo facial semelhante, alcoolista e com transtorno bipolar tipo II. Esta é uma alteração muito rara e realizou-se a correlação genótipo-fenótipo comparando o fenótipo da paciente e seu pai com casos com deleções similares descritos previamente na literatura, envolvendo apenas o *GRM7*. Esta descrição expande o conhecimento sobre o fenótipo relacionado às deleções em 3p26.1 envolvendo o gene *GRM7* e reforça sua relação com transtornos neuropsiquiátricos.

Palavras-chave: deleção *GRM7*, álcool, transtornos neuropsiquiátricos.

INTRODUÇÃO

O gene *GRM7* (Glutamate metabotropic receptor 7) é responsável por um dos tipos de receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs). Já foram identificados oito sub-tipos de mGluRs que foram divididos em três grupos, com base na homologia de suas sequências, mecanismos de transdução de sinal e propriedades farmacológicas: Grupo I (mGluR1 e 5), Grupo II (mGluR2 e 3) e Grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8) (Gyetvai et al, 2011).

Estes receptores tem um papel importante na função cerebral, na transmissão sináptica, plasticidade e desenvolvimento. Contribuem com a aquisição de novas informações, estão envolvidos com a aprendizagem, percepção de dor e memorização (Riedel et al., 2003). São altamente expressos nos neurônios pré e pós-sinápticos no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo e córtex frontal (Shigemoto et al., 1997; O'Connor et al., 2010).

O *GRM7* contém nove éxons e está localizado em 3p26.1-p25.2 (OMIM, 2019), é o receptor mais altamente conservado, modula a liberação do L-glutamato e GABA e está envolvido nos níveis de excitabilidade em circuitos neuronais específicos, influenciando alguns estados como ansiedade e depressão, além de disfunção cognitiva (McQuilin et al., 2011; Nho et al., 2015).

Alguns polimorfismos no gene *GRM7* já foram associados com transtornos neuropsiquiátricos, entre eles esquizofrenia (Shibata et al., 2009; Li et al., 2016), transtorno bipolar (Alliey-Rodrigues et al., 2011; Kandaswamy et al., 2014), déficit de atenção e hiperatividade (Mick et al., 2008; Park et al., 2013), autismo (Yang and Pan, 2013), dificuldades de aprendizagem e predisposição a vícios, como álcool e nicotina (Gyetvai et al, 2011). Estudos mostram também que a subexpressão relacionada a variações genéticas de *GRM7* está associada a déficit de aprendizado, extinção do medo, alterações na percepção da dor, comportamento aversivo, ansiedade, depressão e consumo de álcool (Vadasz et al., 2007; Gee et al., 2014).

Em função destes achados, o sistema glutamatérgico composto pelos mGluRs, principalmente o mGluR7, tem sido considerado um alvo terapêutico relevante (O'Connor et al., 2010; Nho et al., 2015).

Aqui nós descrevemos o fenótipo físico e comportamental associado a uma variante nova, uma deleção extensa em *GRM7*, em uma paciente e seu pai.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE nº 16525913.1.0000.5404). Após a obtenção do termo de

consentimento, foram coletados de 8 a 12 mL de sangue periférico da paciente e de seus genitores, e o DNA foi isolado por métodos padronizados.

Inicialmente foram realizadas as técnicas de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando-se a sonda DiGeorge/VCFS TUPLE1 + 22q13.3 *Deletion Probe Combination* (Cytocell Aquarius®) e *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), com a utilização do kit P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland MLPA). Ambas as técnicas não revelaram nenhuma alteração. A seguir, foi realizada a técnica de Análise Cromossômica por *microarray* (ACM) com a plataforma *GeneChip System CytoScan HD™* (Affymetrix®) e o kit de reagentes compatível (Affymetrix®). A partir dos dados gerados, as variações do número de cópias (CNVs – *Copy number variants*) foram determinadas através do software ChAS (*Chromosome Analysis Suite*). Para a avaliação da qualidade dos dados, três parâmetros de qualidades recomendados pelo fabricante foram utilizados: SNPQC - *Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*; MAPD - *Median Absolute Pairwise Difference* e WavinessSD - *Waviness Standard Deviation*. O grupo controle de referência da população brasileira, utilizado como auxílio na interpretação dos resultados, foi montado utilizando-se dados de CNVs de 112 indivíduos da população geral, obtidos por meio de um consórcio de pesquisadores da FCM/UNICAMP. A validação dos resultados ocorreu por meio da técnica de a-CGH (*array Comparative Genomic Hybridization*).

Os testes neuropsicológicos foram realizados na paciente e em seu pai utilizando-se os instrumentos padronizados listados na Tabela complementar I.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A paciente apresentou uma deleção de 606 kb, localizada em 3p26.1 (7.068.146-7.674.195 – GRCh37/hg19), que contém apenas parte do gene *GRM7* (Figure 1). Tal alteração também foi identificada no genitor paterno. Esta CNV não foi descrita anteriormente na população brasileira e nenhuma deleção com mais de 20% de sobreposição de tamanho foi encontrada no DGV (Database of Genomic Variants). Há a descrição apenas de CNVs muito menores nessa região (Figura 1). Nenhuma alteração com pontos de quebra semelhantes foi encontrada no DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*). Assim, essa alteração foi considerada uma variante de significado clínico incerto.

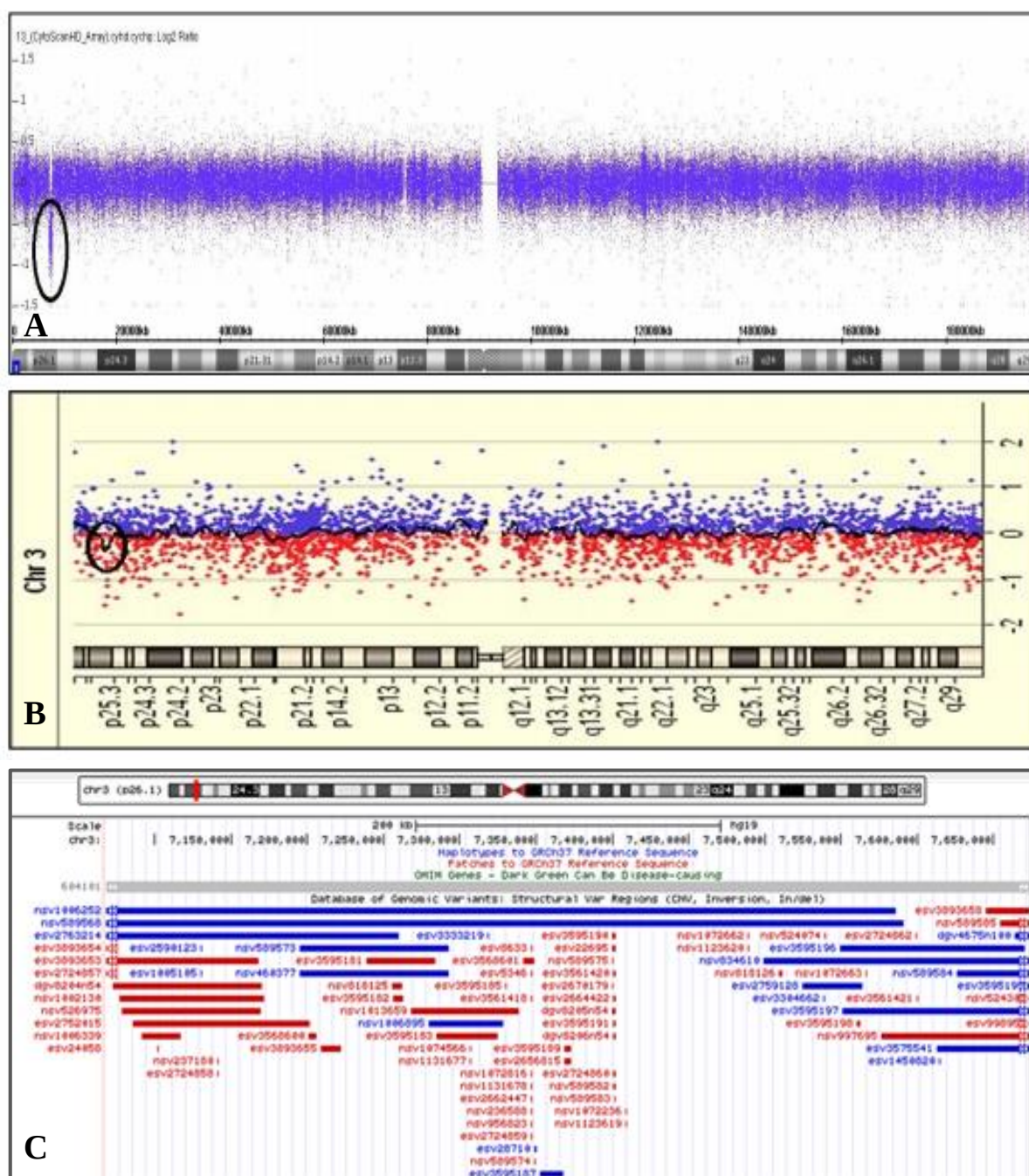


Figura 1: (A) Perfil de hibridação genômica (aGH) com a deleção destacada no círculo e (B) perfil de hibridação genômica comparativa (aCGH) mostrando a deleção 3p26.1 (606 Kb) no círculo em destaque; (C) Análise dos pontos de quebra no UCSC *Genome Browser*, considerando-se descrições do OMIM e DGV (*Database of Genomic Variants*), em cinza a representação do gene *GRM7*, em azul duplicações e em vermelho as deleções já descritas nesta região.

RELATO DO CASO

A paciente, caucasiana, do sexo feminino, com 15 anos de idade, foi selecionada para investigação a partir da triagem de indivíduos participantes do Projeto Crânio-Face Brasil (Monlleó et al., 2013) por apresentar *fácies* atípica, fala anasalada e alterações de comportamento, com hipótese diagnóstica de síndrome de deleção 22q11.2. Única filha de casal

jovem, não consanguíneo, nasceu a termo, de parto cesárea, sem intercorrências, com 2,6 Kg e 48 cm. Apresentou atraso de fala, alterações de comportamento e infecções de repetição desde a primeira infância. As avaliações clínica e laboratorial detalhadas, além da história médica da paciente, revelaram face achatada e alongada, frontal alto, hipotelorismo ocular, fissuras palpebrais estreitas e nariz com ponta discretamente bífida, raiz estreita, ponte alta e hipoplasia alar, fenda palatal submucosa, insuficiência velofaríngea, imunodeficiência por deficiência de IgA, constipação crônica, refluxo gastroesofágico, alteração de processamento auditivo e hiperplasia nodular linfóide do duodeno, relacionada ao diagnóstico de doença celíaca (Figura 2A). A tomografia de crânio e ressonância magnética cerebral não mostraram alterações. A avaliação psicológica revelou deficiência intelectual, déficit de atenção, perseveração, sintomas de ansiedade, especialmente ansiedade social e comportamentos evitativos.

A deleção em 3p26.1 também foi detectada no pai da paciente, com 48 anos de idade e com fenótipo facial semelhante (Figura 2B). O pai da paciente apresenta Transtorno Bipolar tipo II – com episódios hipomaniacos (súbita motivação, animação, início de atividades complexas, sem conclusão) e episódios depressivos maiores. Apresenta tabagismo, alcoolismo em tratamento, com história de várias internações psiquiátricas e de dificuldade de aprendizagem. Iniciou o uso do álcool aos 14 anos e seu genitor também era alcoólatra.



Figura 2: Vista frontal e lateral esquerda da paciente (A) e de seu pai (B).

DISCUSSÃO

Aqui nós descrevemos achados moleculares e fenotípicos de uma paciente e seu pai, relacionados à deleção do gene *GRM7*. A CNV detectada envolve sete éxons deste gene e, até onde pudemos investigar, nenhuma deleção com a mesma extensão foi relatada anteriormente, tanto em bases de dados da população geral como de indivíduos com fenótipo anormal. Entre

os indivíduos relatados, fenotipicamente afetados, com deleções grandes em 3p26.1 envolvendo somente o *GRM7*, há a descrição de um indivíduo do sexo masculino que apresentava convulsões, com uma deleção de 116,78 kb, que foi classificada como benigna. Mas ele também apresentava outra CNV (duplicação de 811,66 kb em 11q22.3), que foi classificada como variante de significado incerto (DECIPHER case #288127). Uma menina com uma deleção de 185,37 kb apresentava atraso do crescimento e do desenvolvimento global, filtro apagado e lábio superior fino (DECIPHER case #356330). Outro homem, com uma deleção de 96,05 kb, apresentava dificuldades cognitivas e alterações comportamentais (DECIPHER case #367156) (Firth et al., 2009). Tais fenótipos, embora com algumas características semelhantes, diferem do apresentado por esta paciente e seu pai.

O gene *GRM7* (Glutamate metabotropic receptor 7), um dos mGluRs, tem um papel importante na função cerebral, além de estar envolvido com a aprendizagem, ansiedade e memória (Riedel et al., 2003). Estudos anteriores associaram CNVs encontradas no gene *GRM7* com autismo, esquizofrenia, atraso de desenvolvimento, transtorno bipolar, deficiência intelectual e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (McQuillin et al., 2011; Elia et al., 2012; Kandaswamy et al., 2014; Liu et al., 2015), compatíveis com as alterações observadas nos casos aqui descritos. Além disso, o mGluR7 influencia diferentes estados como ansiedade e depressão, bem como disfunção cognitiva (McQuillin et al., 2011), o que também reforça a relação entre a CNV encontrada e os transtornos neuropsiquiátricos da paciente e de seu pai.

Quanto à adicção a drogas, deve ser considerado que o gene *GRM7* está associado a múltiplos processos neuronais que estão relacionados com o uso de substâncias e desenvolvimento de vícios, como por exemplo, o alcoolismo. É um gene considerado de susceptibilidade ao consumo de álcool (Melroy-Greif et al., 2011). A expressão constitucionalmente baixa de *GRM7* atribuída a variações genéticas predispõe ao consumo excessivo desta substância, contribuindo com a predisposição à dependência. Esses dados são explicados pelo fato da neurotransmissão glutamatérgica implicar em ação estimulante e, conseqüentemente, com a dependência de drogas (Gyetyvai et al, 2011). Isso poderia explicar, inclusive, o alcoolismo do pai da paciente. Infelizmente, seu avô paterno, que também era alcoólico, não pôde ser avaliado porque já havia falecido.

Além dos achados comportamentais, também foram observados sinais clínicos dismórficos, maiores e menores, na paciente e em seu pai, que podem estar associados à deleção. Não foram encontrados relatos destes achados em outros pacientes com deleções em

3p26.1 e envolvimento apenas do *GRM7*. Entretanto, também, nenhum deles apresentava a mesma deleção.

Diante dos achados da literatura, que associam alterações no gene *GRM7* com alterações neuropsiquiátricas, o fenótipo dos casos aqui apresentados pode ser associado à deleção neste gene. Contudo, considerando-se os aspectos dismórficos não relatados anteriormente, não está claro se a deleção também pode ser associada aos distúrbios faciais e à fenda palatal.

No entanto, é necessária a análise funcional do gene alterado, a fim de esclarecer o espectro fenotípico. A CNV permanece classificada como uma variante de significado incerto, porém, com potencial patogênico que necessita ser esclarecido.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos pacientes que participaram do estudo, ao CNPq e PPSUS/Fapesp (2012/51799-6) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alliey-Rodriguez, N., Zhang, D., Badner, J. A., Lahey, B. B., Zhang, X., Dinwiddie, S., Gershon, E. S. (2011). Genome-wide association study of personality traits in bipolar patients: *Psychiatric Genetics*, 21(4), 190–194.
- DGV. Database of genomic variants. (n.d.). Retrieved January 15, 2019, from <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
- Elia, J., Glessner, J. T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C. J., Hadley, D., Hakonarson, H. 2012. Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nature Genetics*, 44:78–84.
- Firth H. V, Richards, S. M., Bevan, A. P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Van Vooren S., Moreau, Y., Pettett, R. M., Carter, N. P. 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Gene.*, 84(4):524-33.
- Gee, C. E, Peterlik, D., Neuhauser, C., Bouhelal, R., Uschold-Schmidt, N., Feuerbach, D., Zimmermann, K., Ofner, S., Cryan, J. F., van der Putten, H., Frendt, M., Vranesic, I., Glatthar, R., Flor, P. J. 2014. Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGlu7) via the venus flytrap domain (VFTD) inhibits amygdala plasticity, stress, and anxiety-related behavior. *J. Biol. Chem.*, 289:10975-10987.
- Gyetvai, B., Simonyi, A., Oros, M., Saito, M., Smiley, J., Vadász, C. 2011. mGluR7 genetics and alcohol: intersection yields clues for addiction. *Neurochemical Research*, 36(6):1087–1100.

- Kandaswamy, R., McQuillin, A., Curtis, D., Gurling, H. 2014. Allelic association, DNA resequencing and copy number variation at the metabotropic glutamate receptor GRM7 gene locus in bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 165B:365–372.
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., Dong, R., Yang, X., Tammimies, K., Gai, Z. 2015. Rare de novo deletion of metabotropic glutamate receptor 7 (*grm7*) gene in a patient with autism spectrum disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 168B:258–264.
- Li, W., Ju, K., Li, Z., He, K., Chen, J., Wang, Q., Shi, Y. 2016. Significant association of GRM7 and GRM8 genes with schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population. *European Neuropsychopharmacology*, 26(1), 136–146.
- McQuillin, A., Bass, N., Anjorin, A., Lawrence, J., Kandaswamy, R., Lydall, G., Gurling, H. 2011. Analysis of genetic deletions and duplications in the University College London bipolar disorder case control sample. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 19:588–592.
- Melroy-Greif, W. E., Vadasz, C., Kamens, H. M., McQueen, M. B., Corley, R. P., Stallings, M. C., Ehringer, M. A. 2016. Test for association of common variants in GRM7 with alcohol consumption. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 55, 43–50.
- Mick, E., Neale, B., Middleton, F. A., McGough, J. J., Faraone, S. V. 2008. Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 147B:1412–1418.
- Monlleó I.L., Fontes M.I.B., Ribeiro E.M., Souza J., Leal G.F., Félix T.M., Fett Conte A.C., Bueno BH, Magna LA, Mossey PA, Gil-da-Silva-Lopes VL. 2013. Implementing the Brazilian database on orofacial clefts. *Plast Surg Int*, 2013:1-10.
- Nho, K., Ramanan, V. K., Horgusluoglu, E., Kim, S., Inlow, M. H., Risacher, S. L., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). 2015. Comprehensive gene- and pathway-based analysis of depressive symptoms in older adults. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 45(4), 1197–1206.
- O'Connor, R. M., Finger, B. C., Flor, P. J., & Cryan, J. F. 2010. Metabotropic glutamate receptor 7: at the interface of cognition and emotion. *European Journal of Pharmacology*, 639:123–131.
- Omim - online mendelian inheritance in man. (n.d.). Retrieved January 15, 2019, from <https://www.omim.org/>.

- Park, S., Jung, S.W., Kim, B. N., Cho, S. C., Shin, M. S., Kim, J. W., Kim, H. W. 2013. Association between the GRM7 rs3792452 polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in a Korean sample. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, 9:1.
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140:1–47.
- Shibata, H., Tani, A., Chikuhara, T., Kikuta, R., Sakai, M., Ninomiya, H., Fukumaki, Y. 2009. Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, GRM4 and GRM7, with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 167:88–96.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Mizuno, N. 1997. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(19):7503–7522.
- Vadasz, C., Saito, M., Gyetvai, B. M., Oros, M., Szakall, I., Kovacs, K. M., Prasad, V.V.T.S, Toth, R. 2007. Glutamate receptor metabotropic 7 is cis-regulated in the mouse brain and modulates alcohol drinking. *Genomics*, 90:690-702.
- Yang, Y., Pan, C. 2013. Role of metabotropic glutamate receptor 7 in autism spectrum disorders: a pilot study. *Life Sciences*, 92:149–153.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1: (A) Perfil de hibridação genômica (aGH) com a deleção destacada no círculo e (B) perfil de hibridação genômica comparativa (aCGH) mostrando a deleção 3p26.1 (606 Kb) no círculo em destaque; (C) Análise dos pontos de quebra no UCSC Genome Browser, considerando-se descrições do OMIM e DGV (*Database of Genomic Variants*), em cinza a representação do gene *GRM7*, em azul duplicações e em vermelho as deleções já descritas nesta região.

Figure 2: Vista frontal e lateral esquerda da paciente (A) e de seu pai (B).

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar I: Testes padronizados utilizados para avaliação neuropsicológica.

Caso índice	Pai
Entrevista psicológica com a paciente e familiares	Entrevista psicológica com o pai e familiares (filha e esposa)
Questionário de Capacidades e Dificuldades (SDQ)	Inventário de Depressão de Beck (BDI)
Inventário de Depressão Infantil (CDI)	Inventário de Ansiedade de Beck (BAI)
Escala Multidimensional de Ansiedade para Crianças (MASC)	Inventário de Estresse para adultos de Lipp (ISSL)
	Entrevista Clínica Estruturada – edição revisada (CIS-R)

SYNDROMIC ORAL CLEFTS: CHALLENGES OF GENETIC ASSESSMENT IN BRAZIL

Vera Gil-da-Silva-Lopes¹, Marshall Fontes², Ana Santos¹, Agnes Fett-Conte³, Marina Francisquetti³, Isabella Monlleó⁴

1. Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil
2. Maternal-Child and Adolescent Health Center, Center for Maternal and Child Health, Health Sciences Center, State University of Health Sciences of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil
3. Department of Molecular Biology, Genetics, Hospital de Base, School of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
4. Faculty of Medicine, Clinical Genetics Service, University Hospital, Federal University of Alagoas. Maceió, Alagoas, Brazil

Short Title: Addressing syndromic oral clefts in Brazil

Corresponding author:

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.

Department of Medical Genetics

School of Medical Sciences

University of Campinas

Campinas, São Paulo, Brazil

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Caixa Postal 6111 – CEP 13084-971. Campinas, SP, Brazil.

Tel/Fax +55 (19) 3788-8909

e-mail: vlopes@fcm.unicamp.br

Keywords: Cleft Lip; cleft palate, oral clefts; Chromosomal Microarray Analysis, Genetic Counseling, Public Health

ABSTRACT

Addressing unmet health needs of persons living with congenital anomalies in low and middle-income countries (LMIC) is a major challenge. Registries and databases are exemplary tools capable to link research data with health programs. Since 2009, Brazil's Craniofacial Project (BCFP), a multicenter and voluntary research initiative, collects socioeconomic, medical and genetic information on individuals with craniofacial anomalies through the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies (BDCA). The aim of this short communication is to inform the debate on challenges to the provision of genetic assessment and counseling for individuals with Syndromic Oral Clefts (SOC) through public health services in LMIC, such as Brazil. Subjects were selected using BDAC methods as described elsewhere. Among 800 registered cases, 73 assigned as having SOC with no etiologic diagnosis were preselected for genomic imbalances screening. Only 28 have timely reached baseline laboratory and image tests using public health services facilities, and 22 were able to perform Chromosomal Microarray Analysis. Genomic imbalances were identified in 4 (18.24%) of them, two of which needed further investigation for etiologic diagnosis and genetic counseling. Results exemplify barriers faced by the majority of population of Brazil to reach whole genetic assessment either through public genetic services or in research settings. In this unfavorable scenario, BBAC has allowed the recognition of individuals with similar needs, optimizing the scarce genetic laboratory facilities in Brazil. Ultimately, BDAC has facilitated translation of research into care. This experience may be successfully extended to other congenital anomalies and to LMIC with similar characteristics.

BRAZILIAN POLICES ON CONGENITAL ANOMALIES: THE CASE OF ORAL CLEFTS

Brazil is a continental, multiethnic and multicultural country with marked regional differences in economic development and access to health services. The majority of the population accesses the public health system, so called *Sistema Unico de Saude* (SUS). SUS has been implemented through the Federal Constitution of 1988, under the principles of universality, equity and integrality, which free-of-charge medical services to the entire population, from basic to complex procedures [1,2].

Since the 1990s, government measures have been implemented to support the diagnosis and treatment of congenital anomalies and genetic disorders in Brazil. Guidelines and ordinances were enacted in order to meet the peculiarities of various subgroups of genetic diseases, as for example the oral clefts (OC) services accreditation [3-12].

OC are congenital anomalies present in 1:600-1,000 live births. They are associated with high neonatal morbidity and mortality, significantly impact the quality of life, and require treatment by multidisciplinary teams, for what they have been considered a public health problem by the World Health Organization (WHO) [13,14, 16-19].

OC comprise a broad phenotype spectrum and are characterized by the partial or complete impairment of the lip (cleft lip), of the palate (cleft palate) or both (cleft lip and palate), uni or bilaterally [15-17, 20, 21]. In about 30% of cases there are other concomitant anomalies, which is called syndromic OC (SOC) [22-24]. Single gene alterations, teratogens and chromosomal abnormalities constitute the main etiologies in the group of SOC. However, in about 50% of these cases, the etiology is not clear [25-27].

Chromosomal alterations occur in 10 to 30%, comprising numeric and structural aberrations, and variations of copies of DNA (copy number variation – CNVs), which include microdeletions and microduplications. For this reason, chromosomal microarray analysis (CMA) has been used routinely as diagnostic screening in developed world [28-34].

Etiologic assessment of genetic diseases in Brazil is hampered by the shortage of medical geneticists and specialized centers as well as by limited access to specific tests [1, 2, 12, 35-38]. In the case of OC, genetic assessment is not included among required procedures that a specialized service should provide. Up to now, hospitals accredited by the Ministry of Health as specialized units mostly focus on rehabilitation [3, 6, 7].

The newly created National Policy on Comprehensive Care for People with Rare Diseases is aimed to overcome some unmet needs such as clinical evaluation and diagnostic

tests in genetics [4]. Therefore, in addition to karyotype already included [47], this ordinance encompasses fluorescent *in situ* hybridization (FISH), the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), CMA, and DNA sequencing [4]. However, studies on feasibility, costs and implementation strategies have not been carried out.

Brazil's Craniofacial Project (<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>), active since 2003, is a multicenter and voluntary initiative aimed to provide scientific subsidies to improve healthcare for persons living with craniofacial anomalies through applied research.

One of its products was the development and implementation of the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies (BDCA) and the CranFlow – Craniofacial Anomalies: registry, flow and management, an online application for standard collection, storage and treatment of socioeconomic, demographic, clinical and genetic information [38].

In this short communication authors discuss challenges of the provision of genetic assessment and counseling for individuals with Syndromic Oral Clefts (SOC) through the health system of Brazil and present BDCA as a tool for translating research results to healthcare setting.

FROM CLINICAL TO RESEARCH SETTING AND VICE VERSA: THE EXPERIENCE OF BRAZIL'S CRANIOFACIAL PROJECT

Six BCFP-collaborating centers where genetic assessment of individuals with SOC is part of the routine-care agreed to participate. Demographic, socioeconomic, clinical and genetic information of subjects were recorded through CranFlow to feed BDCA as described elsewhere [38].

The study protocol was approved by local and national Research Ethics Boards (# 668/2007, and 059/2008, 709/2008). Subjects or their guardians have given informed consent.

From a universe of 800 cases recorded, 73 subjects already diagnosed with SOC but with no recognizable etiology were pre-selected to screening by CMA. Cases with atypical oral clefts were excluded.

In order to improve genotype-phenotype correlation, peripheral blood karyotype with G-band pattern, cardiac ultrasonography (CUS), and abdominal ultrasound (AUS) were baseline-required tests. Magnetic resonance imaging of the skull and brain (MRI) was added for cases with neuropsychomotor development delay and (or) intellectual disabilities

(NPMD/ID). Accordingly, these baseline tests should be performed using local facilities through SUS while a single BCFP unit for which biologic samples were sent provided CMA.

CMA was performed using chips CytoScan750K (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), in accordance with the manufacturer's recommendations. Data analysis was carried out according to the recommendations proposed by Palmer et al. [40] and an in-house protocol.

Of the 73 pre-selected cases, 31 (42.5%) were from the Northeast, 25 (34.2%) from the South and 17 (23.3%) from the Southeast of Brazil. The age at the time of enrollment ranged from less than one to 37 years, with 34 (46%) individuals aged less than one year (mean = 4.25; median = 1.00 and SD = 7.49 years).

Baseline tests were concluded by 28/73 individuals. Figure 1 shows the distribution of individuals who underwent CUS, AUS, MRI and karyotype test, according to geographic region. Thirty individuals showed heart diseases, ten presented brain malformation and one showed 46,XX,add(22)(q13) karyotype.

Screening by CMA, conducted in 22/28 individuals, identified alterations in 4 (18.24%). Among these, two were pathogenic and two potentially pathogenic alterations, requiring complementary and customized laboratory techniques for elucidation. Cases are described as follows.

Case 1: three years old boy, single son of nonconsanguineous young couple, with no familial recurrence. He showed intrauterine growth restriction, failure to thrive, NPMD, recurrent otitis, feeding difficulties, hyperactivity, palatal cleft and other minor congenital defects (MCD). Karyotype, CUS, AUS and MRI tests were normal. A pathogenic genomic imbalance (17p13.3 microdeletion) was detected [41].

Case 2: 30-days old girl of a nonconsanguineous young couple, with no familial recurrence. She presented palatal cleft, and multiple MCD. She evolved with failure to thrive, NPMD, episodes of upper gastrointestinal bleeding due to vascular anomalies. CUS showed atrial septal defect and tricuspid insufficiency. AUS presented cavernous transformation of the portal vein, dilation of splenic vein and left renal agenesis. Digestive endoscopy revealed esophageal varix, hypertensive gastropathy and duodenal erosion. MRI was normal. Karyotype was 46,XX,add(22)(q13). Additional material was identified by FISH (probes BAC RP11-35P16, RP11-27M24) as a segment of the short arm of chromosome 16. CMA revealed a pathogenic imbalance (microduplication 16p13.2-16p13.3 and microdeletion 22q13.33). Another platform of CMA (SNP-array 850K Illumina®) was used for confirmation of results [42].

Case 3: thirteen years old boy, first son of a nonconsanguineous young couple, with medical history of NPMD in a sister. He was short, presented NPMD/ID, palatal cleft and other MCD. Karyotype, CUS and AUS tests were normal. MRI revealed subcortical heterotopia. Potentially pathogenic genomic imbalance (microduplication Xq24-Xq26.1) was detected [43]. Total elucidation of this case depends on X-chromosome inactivation studies on the individual and his parents.

Case 4: three years and four months old boy, first son of a nonconsanguineous young couple, with no familial recurrence. He showed intrauterine growth restriction, failure to thrive, NPMD, delayed bone maturation, penoscrotal inversion, right cryptorchidism, and other MCD. AUS showed horseshoe kidney with significant hydronephrosis. Karyotype, CUS and transfontanellar ultrasound showed no abnormalities. CMA revealed a 16p13.11 deletion, with no gene content, and a 2q36.3-2q37.1 potentially pathogenic deletion. Parents' assessment is critical for the completion of this etiologic investigation.

Present study was conducted in a sample of individuals with SOC from the three most populous regions of Brazil. There was wide variation in age at first genetic assessment, which included adults. This bad situation reflects the difficulty of access and scarcity of specialized services in SUS, as already mentioned in several other studies [1, 35, 44-48].

The baseline diagnostic tests (karyotype, CUS, AUS and MRI) using SUS facilities were completed in only one third of the 73 cases. Frequency of individuals who had performed CUS, karyotype and AUS was higher than 60%. The low frequency of MRI may be related to the unavailability of this test, which is assigned as complex procedure in SUS.

Although karyotype is the more widely available genetic test in SUS [49], higher rates of subjects with karyotype were precisely found in services that have own cytogenetic laboratory, mainly serving to research purposes. Problems of access to genetic tests through SUS have been emphasized in studies with different approaches [1, 6, 35, 39, 45, 47, 48].

Besides unavailability and limited access, non-attendance of the users at medical appointments is a recurrent problem across the Country, with rates generally above 25%. There is a myriad of factors underpinning abandonment of medical follow-up. Long time elapsed to complete medical assessment through SUS, comorbidities and associated mortality, as well as socioeconomic barriers, contributes to this situation [47, 48, 50-52].

It is noteworthy that above-mentioned baseline tests are indispensable to the genotype-phenotype correlation. Incomplete phenotype characterization hinders this correlation and, in many circumstances, the definition of pathogenicity of the genomic imbalance detected.

In economic developed world, CMA is established as a screening test for congenital anomalies and intellectual disability [53] and, in many situations, it enables the etiologic diagnosis [54, 55]. Furthermore, CMA of parents is critical to recognize inherited variants and to define pathogenicity as exemplified by case 4 here reported. Thus, extending genetic etiologic assessment to parents and other family members should be seen as a right rather than a scientific research issue.

In this study, genomic imbalances were identified with similar frequencies to those described by Anh et al. [30] and Dorfman et al. [31]. The genotype-phenotype correlation enabled the conclusive diagnosis in two individuals (cases 1 [41] and 2 [42]), while complementary approaches are needed in the other two cases. Unavailability of complementary genetic tests in either the laboratories associated to the BCFP and SUS has prevented the whole assessment and genetic counseling of these cases.

FINAL REFLECTIONS AND SUGGESTIONS

This is a national pilot study on etiologic assessment of individuals with SOC juxtaposing clinic and research scenarios. CMA results revealed causative genomic imbalances, corroborating the literature regarding the applicability of this technology in these cases. Results also have revealed barriers faced by the majority of population of Brazil to reach complete genetics assessment either through public health services or in research settings.

From the perspective of the National Policy on Comprehensive Care for People with Rare Diseases, and considering Brazil's continental dimension and limited resources, it would be reasonable to draw and implement a national diagnostic network according levels of technic complexity. This network would optimize financial and human resources, decrease the waiting time for diagnosis, and bring health genetic services closer to the principles of universality, equity and integrality of the actual health system. It would also help to move Brazil towards genomic medicine era.

The use of databases in health is a strategy for gathering relevant information for public policies. In Brazil, such as in other LMIC, information on congenital anomalies is limited to birth prevalence and associated mortality, which hinders a comprehensive epidemiologic and health needs characterization.

BCFP-collaborating services has been feeding BDCA with demographic, socioeconomic, clinical and genetic data through a standard method since 2009. Information gathered has allowed the recognition of individuals with similar needs regarding etiologic assessment. From community viewpoint, this strategy enables not only the optimization of

resources for diagnosis, but also the recognition of characteristics of population-groups, which is a valuable subsidy when formulating public policies.

Besides collective benefits, this approach has allowed genetic counseling for subjects and their families. Ultimately, BDAC has facilitated translation of research into care. The experience here reported may be successfully extended to other congenital anomalies and to LMIC with similar characteristics.

STATEMENTS

1. Acknowledgement

The authors thanks patients and their parents, BCFP-collaborating group specially to Doctors Denise Cavalcanti, Têmis Felix, Ana Xavier, Joseane Souza, Gabriela Ferraz and Erlane Ribeiro for partnership, Doctors Ilária Sgardioli and Tarsis Vieira for laboratory support, Roberta Volpe-Aquino for technical support, and Espaço da Escrita – Pro-Reitoria de Pesquisa-Unicamp for the language service provided.

2. Statement of Ethics

Subjects or their parents or guardians have given their written informed consent.

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the FCM/Unicamp (# 668/2007 and 059/2008) and by National Ethics Committee (# 709/2008).

3. Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

4. Funding Sources

This study was supported by State of São Paulo Research Foundation, FAPESP (# 2012/51799-6), State of Alagoas Research Foundation, FAPEAL (#60030 000707/2013), and National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (#460422/2014-6). V.L.G.S.L. is also supported by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (No. 305985/2017-5).

5. Author Contributions

VGSL, MF, IM: Study design and analysis, manuscript drafting and review.

AS: CMA analysis, manuscript drafting and review

AFC, MF: manuscript drafting and review.

REFERENCES

1. Brasil. Portaria SAS/MS nº 62, 19 de abril de 1994. Normaliza cadastramento de hospitais que realizem procedimentos integrados para reabilitação estético-funcional dos portadores de má formação labiopalatal para o Sistema Único de Saúde, e dá outras providências. Diário Oficial da União 1994; 20 abr.
2. Brasil. Portaria GM/MS nº 199, de 30 de janeiro de 2014. Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras. Diário Oficial da União, seção 1, no 22, 31 de janeiro de 2014. Brasília; 2014.
3. Monlleó IL, Gil-da-Silva-Lopes VL: Anomalias craniofaciais: descricao e avaliacao das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. Cad Saude Publica. 2006;22:913-922.
4. Monlleo IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Brazil's Craniofacial Project: genetic evaluation and counseling in the reference network for craniofacial treatment. Cleft Palate Craniofac J. 2006;43:577-579.
5. Monlleó IL, Mossey PA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Evaluation of craniofacial care outside the Brazilian reference network for craniofacial treatment. Cleft Palate Craniofac J. 2009;46:204-211.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GS/MS Nº 822, de 6 de junho de 2001. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal / PNTN. Diário Oficial da União, seção 1, nº33, 07 de junho de 2001; Brasília; 2001.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GMS/MS nº 1.278, 20 de outubro de 1999. Aprova os Critérios de Indicação e Contra-Indicação de Implante Coclear no Sistema Único de Saúde, e dá outras providências. Diário Oficial da União, seção 1, nº90, 21 de outubro de 1999; Brasília; 1999.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 2.607, 10 de dezembro de 2004. Aprova o Plano Nacional de Saúde/PNS – Um Pacto pela Saúde no Brasil no Sistema Único de Saúde, e dá outras providências. Diário Oficial da União, seção 1, nº69, 13 de dezembro de 2004; Brasília; 2004.
9. Portaria SCTE/MS nº 30, 30 de junho de 2015. Torna pública a decisão de incorporar no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico aparentado para tratamento da doença falciforme, conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde. Diário Oficial da União, seção 1, nº50, 01 de julho de 2015; Brasília; 2015.

10. Aith F, Bujdoso Y, Nascimento PR, Dallari SG. Os princípios da universalidade e integralidade do SUS sob a perspectiva da política de doenças raras e da incorporação tecnológica. *R. Dir. Sanit.* 2014;15:(1)10-39.
11. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2013;163C(4):246-58.
12. Khandelwal KD, van Bokhoven H, Roscioli T, Carels CE, Zhou H. Genomic approaches for studying craniofacial disorders. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2013;163C:218–231.
13. Gallagher ER, Siebold B, Collett BR, Cox TC, Aziz V, Cunningham ML. Associations between laterality of orofacial and medical and academic outcomes. *Am J Med Genet A.* 2018;176:267-76.
14. Mossey PA, Shaw WC, Munger RG, Murray JC, Murthy J, Little J. Global oral health inequalities: challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. *Adv Dent Research.* 2011;23:247-258.
15. Rando GM, Jorge PK, Vitor LLR, Carrara CFC, Soares S, Silva TC et al. Oral health-related quality of life of children with oral clefts and their families. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e2017-0106.
16. World Health Organization. Global strategies to reduce the health – care burden of craniofacial anomalies. Report of WHO meetings on International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies. Geneva: World Health Organization; 2002.
17. IPDTC Working Group. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48:66-81.
18. Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:263-83.
19. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *The Lancet.* 2009;374:1773-1785.
20. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12:167-78.
21. Beriaghi S, Myers SL, Jensen SA, Kaimal S, Chan CM, Schaefer GB. Cleft lip and palate: association with other congenital malformations. *J ClinPediatr Dent.* 2009;33:207-10.

22. Setó-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *Europ J Med Genet*. 2014;57:381-93.
23. Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilha EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:1588-1596.
24. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008;87(2):119-25.
25. Gil-da-Silva-Lopes VL, Monlleo, IL. Risk factors and the prevention of oral clefts. *Braz Oral Res*. 2014;28:1-5.
26. Maarse W, Rozendaal AM, Pajkrt E, Vermeij-Keers C, Mink van der Molen AB, van den Boogaard MJ. A systematic review of associated structural and chromosomal defects in oral clefts: when is prenatal genetic analysis indicated?. *J Med Genet*. 2012;49:490–498.
27. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010;12:742-745.
28. Anh JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals – results from four years’ clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogen*. 2013;6:16.
29. Dorfman LE, Leite JC, Giugliani R, Riegel M. Microarray-based comparative genomic Hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *J Pediatrics (Rio J)*. 2015;91:59-67.
30. Chien SC, Li YC, Li LH, Wu JY, Hsu PC, Shi SL, Tsai FJ, Lin CC. A new familial insertion, ins(18;9) (q12.2;q33.1q31.1) with a 9q31.1-9q33.1 deletion in a girl with a cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1862-7.
31. Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilia MA, Christensen K, et al. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *BirthDefects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85:42-51.
32. Rojnueangnit K, Mikhail FM, Cui X, Yu S, Robin NH. Predictor(s) of Abnormal Array Comparative Genomic Hybridization Results in Patients With Cleft Lip and/or Palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2014;52:724-31.

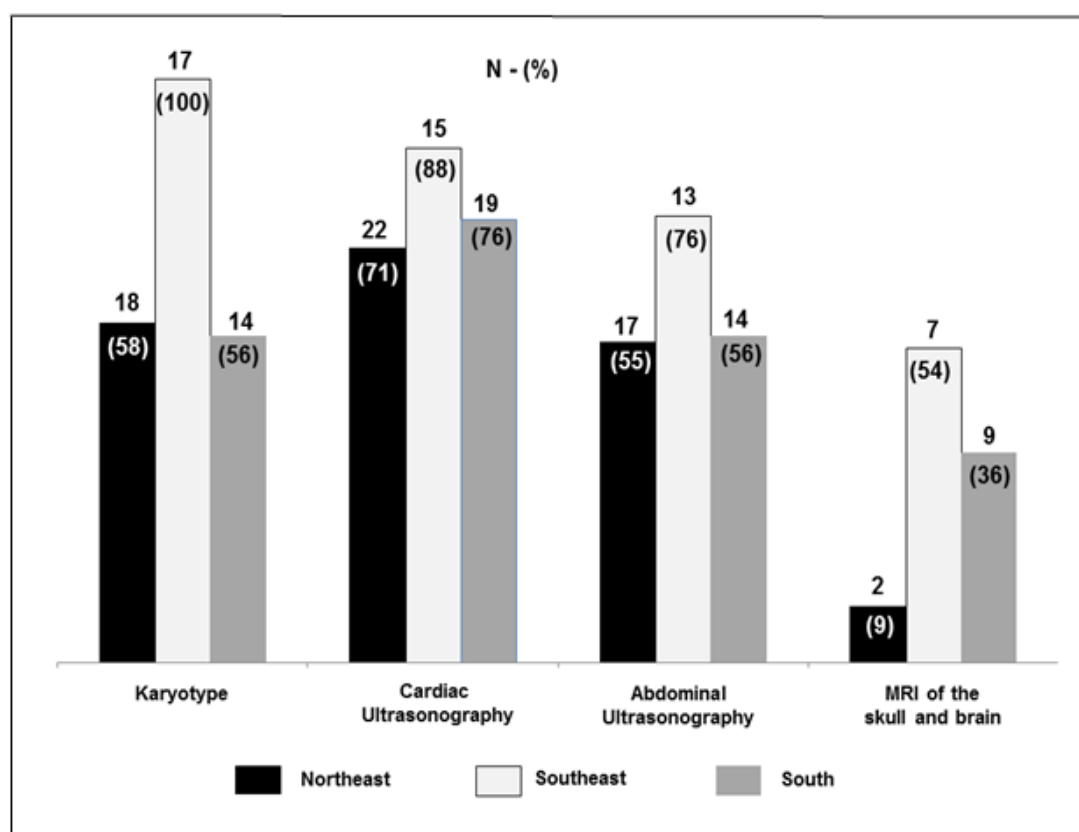
33. Horovitz DDG, Llerena JC, Mattos RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: características do atendimento e propostas para formulação de políticas públicas em genética clínica. *Cad Saude Publica*. 2006;22:2599-2609.
34. Horovitz DDG, Ferraz VEF, Dain S, Marques-de-Faria AP. Genetic services and testing in Brazil. *J Community Genet*. 2013;4:355–375.
35. Passos-Bueno, MR, Bertola D, Horovitz DDG, Ferraz VEF, Brito LA. Genetics and genomics in Brazil: a promising future. *Mol Genet Genomic Med*. 2014; 2(4):280-291.
36. Gibbon S, Aureliano W. Inclusion and exclusion in the globalisation of genomics; the case of rare genetic disease in Brazil. *Anthropology & Medicine*. 2018; 25(1):11-29.
37. Giugliani R, Vairo FP, Riegel R, Souza CFM, Schwartz IVD, Pena SDJ. Rare disease landscape in Brazil: report of a successful experience in inborn errors of metabolism. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2016;11(76):1-8.
38. Volpe-Aquino RM, Monlleó IL, Lustosa-Mendes E, Mora AF, Fett-Conte AC, Felix TM et al. CranFlow: An Application for Record-Taking and Management Through the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies. *Birth Defects Research*. 2018;110:72–80.
39. Monlleó IL, Fontes MIB, Ribeiro EM, Souza J, Leal GF, Félix TM, FettConte AC, Bueno BH, Magna LA, Mossey PA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Implementing the Brazilian database on orofacial clefts. *Plast Surg Int*. 2013;2013:1-10.
40. Palmer, E., Speirs, H., Taylor, P.J., Mullan, G., Turner, G., Einfeld, S., Tonge, B. and Mowat, D. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A* 164A. 2014;377-85.
41. Fontes MI, Santos AP, Torres FR, Lopes-Cendes I, Cendes F, Appenzeller S, Araujo TK, Monlleó IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. 17p13.3 Microdeletion: insights on genotype-phenotype correlation. *Mol Syndromol*. 2017;8:36-41.
42. Fontes MI, Santos AP, Molck MC, Simioni M, Nascimento DL, Andrade AK, Krepschi AC, Appenzeller S, Monlleó IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Genotype-phenotype correlation of 16p13.3 terminal duplication and 22q13.33 deletion: natural history of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2016;170:766-72.
43. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). [Internet]. Baltimore:McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University. 1966. Disponível em: <https://www.omim.org/>.

44. Monlleo IL, Barros AGR, Fontes MIB, Andrade AKM, Brito GM, Nascimento DLL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Diagnostic implications of associated defects in patients with typical orofacial clefts. *J Ped.* 2015;91:458-492.
45. Fontes MIB, Almeida LN, dos Santos KM, dos Anjos FS, de Andrade AK, Porciuncula CG, et al. Local Strategies to Address Health Needs of Individuals With Orofacial Clefts in Alagoas, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013;50:424-31.
46. Vieira TP, Sgardioli IC, Gil-da-Silva-Lopes VL. Genetics and public health: the experience of a reference center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. *J Community Genet.* 2013;4:99-106.
47. Melo DG, Sequeiros J. The challenges of incorporating genetic testing in the unified national health system in Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(7):651-5.
48. Lima MAFD, Gilbert ACB, Horovitz DDG. Redes de tratamento e as associações de pacientes com doenças raras. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2018;23(10):3247-3256.
49. Brasil. Portaria GM/MS nº 2.639, 29 de dezembro de 2016. Inclui as descrições e alterações de valores e instrumentos de registro na Portaria nº 2.848/GM/MS, de 06 de novembro de 2007, que publica a Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais - OPM do Sistema Único de Saúde, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 2016; 29 nov.
50. Oleskovicz M, Oliva FL, Hildebrand-Grisi CC, Lima AC, Custódio I. Técnica de overbooking no atendimento público ambulatorial em uma unidade do Sistema Único de Saúde. *Cad. Saúde Pública.* 2014;30:1009-17.
51. Bittar OJNV, Magalhães A, Martines CM, Felizola NGB; Falcão LHB. Absenteísmo em atendimento ambulatorial de especialidades no estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista.* 2016;13(152):19-32.
52. Cavalcanti RP, Cruz DF, Padilha WWN. Desafios da Regulação Assistencial na Organização do Sistema Único de Saúde. *R bras ci Saúde.* 2018;22(2):181-188.
53. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, 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.* 2010;86: 749–764.
54. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13:680-5.

55. South ST, Brothman AR. Clinical laboratory implementation of cytogenomic microarrays. Cytogenet Genome Res. 2011;135:203-211.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Baseline tests carried out according to geographic region.



5. CONCLUSÕES

1. O estudo das características epidemiológicas e possíveis fatores etiológicos em indivíduos com fendas orais típicas (FOT) sindrômicos e não sindrômicos da BBAC/SJRP/CranFlow[®] mostra que sexo, ascendência nativa e baixa renda familiar são fatores de risco para a casuística investigada.
2. Os fatores etiológicos envolvidos com as FOT são múltiplos e complexos, com destaque para a alta frequência de doenças genéticas, especialmente da Síndrome de Deleção 22q.
3. Há falta de informação dos pacientes e suas famílias sobre fendas orofaciais, o que leva ao atraso no diagnóstico e no tratamento.
4. Embora a maioria dos resultados corrobore os previamente descritos na literatura, os achados do presente trabalho permitem a caracterização dos atendidos no centro colaborador Hospital de Base e acrescentam conhecimento sobre o fenótipo dos afetados.
5. A utilização de um banco de dados consiste numa ótima estratégia para identificar características importantes dos pacientes com FOT. O conhecimento das características epidemiológicas e etiológicas, dos fatores de risco e de acesso a tratamentos específicos por indivíduos com FOT são essenciais para entender a realidade dos pacientes, promover cuidados de saúde adequados e políticas públicas voltadas para a superação de desigualdades.
6. Políticas de educação para a população e a formação de profissionais de saúde qualificados para diagnóstico e orientação ao acesso à saúde de indivíduos com FOT devem ser enfatizadas como uma das prioridades na área.

6. REFERÊNCIAS

- ABULEZZ, T. A. Cleft lip and palate: an experience of a developing center in Egypt. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 28, n. 8, p. e731–e734, 2017.
- BACAL, F. Impact of the brazilian scientific publications on the recent scientific developments in cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 93, n. 6, p. 538–540, 2009.
- BILIŃSKA, M.; OSMOLA, K. Cleft lip and palate-risk factors, prenatal diagnosis, and health consequences. **Ginekologia Polska**, Gdansk, v. 86, n. 11, p. 862–866, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Cuidados com a saúde em situações emergenciais: prevenção, diagnóstico e tratamento**. Brasília, DF, [c2013-2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/atencao-especializada-e-hospitalar/especialidades/cirurgia-plastica-reparadora/fissura-labiopalatal/prevencao-diagnostico-e-tratamento>. Acesso em: 16 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM nº 2600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o regulamento técnico do Sistema Nacional de Transplantes. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 out. 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html. Acesso em: 13 out. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 62, de 19 de abril de 1994. Normaliza cadastramento de hospitais que realizem procedimentos integrados para reabilitação estético funcional dos portadores de má-formação lábio-palatal para o Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 abr. 1994, v. 3, n. 74, p. 73. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/Portaria%20SAS-MS%20no%2062,%20de%2019-04-1994.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2019.
- BURG, M. L. *et al.* Epidemiology, etiology and treatment of isolated cleft palate. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 7, 2016.
- CADASTRO NACIONAL DE ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE (CNES). Indicadores, habilitações: habilitações: 040: Centro de Tratamento da Má Formação Lábio Palatal. **CNESNET**, Brasília, DF, [201-]. Disponível em: http://cnes2.datasus.gov.br/Mod_Ind_Habilitacoes_Listar.asp?VTipo=0401&VListar=1&VEstado=00&VMun=&VComp=&VContador=28&VTitulo=H. Acesso em: 4 jan. 2019.
- CUNHA, E. C. M. *et al.* Antropometria e fatores de risco em recém-nascidos com fendas faciais. **Brazilian Journal of Epidemiology**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 417–422, 2004.
- DIXON, M. J. *et al.* Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nature Reviews: genetics**, London, v. 12, n. 3, p. 167–178, 2011.
- FONTES, M. I. B. **Contribuições para a formulação de estratégias de investigação genética de fendas orofaciais típicas sindrômicas**. 2016. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- FONTES, M. I. B. *et al.* Local strategies to address health needs of individuals with orofacial clefts in Alagoas, Brazil. **The Cleft Palate Craniofacial Journal**, Pittsburgh, v. 50, n. 4, p. 424–431, 2013.

GALLAGHER, E. R. *et al.* Associations between laterality of orofacial clefts and medical and academic outcomes. **American Journal of Medical Genetics: part A**, Hoboken, v. 176, n. 2, p. 267–276, 2018.

GATTI, G. L. *et al.* Cleft lip and palate repair: our experience. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 28, n. 8, p. 1918–1924, 2017.

GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L.; MONLLEÓ, I. L. Risk factors and the prevention of oral clefts. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 28, n. spe, p. 1–5, 2014.

HOSPITAL DE BASE. São José do Rio Preto, [c2019]. Disponível em: <http://www.hospitaldebase.com.br/index-> Acesso em: 28 nov. 2018.

HUMAN PHENOTYPE ONTOLOGY. [S.l.], [c2019]. Disponível em: <https://hpo.jax.org/app/>. Acesso em: 30 jul. 2018.

INTERNATIONAL CLEARINGHOUSE FOR BIRTH DEFECTS MONITORING SYSTEMS (ICBDMS). **Annual Report**. Rome, 2002.

LESLIE, E. J.; MARAZITA, M. L. Genetics of cleft lip and cleft palate. **American Journal of Medical Genetics: part C: seminars in medical genetics**, New York, v. 163, n. 4, p. 246–258, 2013.

MARAZITA, M. L. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 13, n. 1, p. 263–283, 2012.

MARTELLI, D. R. B. *et al.* Association between maternal smoking, gender, and cleft lip and palate. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 81, n. 5, p. 514–519, 2015

MOLCK, M. C. *et al.* Atypical copy number abnormalities in 22q11.2 region: report of three cases. **European Journal of Medical Genetics**, Issy les Moulineaux, v. 56, n. 9, p. 515–520, 2013.

MONLLEÓ, I. L. *et al.* Implementing the Brazilian Database on Orofacial Clefts. **Plastic Surgery International**, New York, v. 2013, p. 1–10, 2013.

MONTEIRO, F. P. *et al.* Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphic evaluation of 194 individuals and review of the literature. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 172, n. 7, p. 927–945, 2013.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (OMIM). Baltimore, Disponível em: <http://omim.org/>. Acesso em: 30 jul. 2018.

REPETTO, G. M. *et al.* Case fatality rate and associated factors in patients with 22q11 microdeletion syndrome: a retrospective cohort study. **BMJ Open**, London, v. 4, n. 11, p. e005041, 2014.

RODRIGUES, K. *et al.* Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 38–42, 2009.

RUITER, E. M. *et al.* No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 64, n. 3, p. 216–219, 2003.

SGARDIOLI, I. *et al.* 22q11.2 deletion syndrome: laboratory diagnosis and TBX1 and FGF8 mutation screening. **Journal of Pediatric Genetics**, Stuttgart, v. 4, n. 1, p. 17–22, 2015.

SILVA, H. P. V. *et al.* Risk factors and comorbidities in brazilian patients with orofacial clefts. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 32, n. e24, p. 1- 12, 2018.

SOUSA, G. F. T. de; RONCALLI, A. G. Orofacial clefts in Brazil and surgical rehabilitation under the Brazilian National Health System. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 31, n. 0, 2017.

SOUZA, J.; RASKIN, S. Clinical and epidemiological study of orofacial clefts. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 89, n. 2, p. 137–144, 2013.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Faculdade de Ciências Médicas. **Projeto Crânio-Face Brasil**. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>. Acesso em: 22 nov. 2018.

VANGKILDE, A. *et al.* Associations between social cognition, skills, and function and subclinical negative and positive symptoms in 22q11.2 deletion syndrome. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, London, v. 8, n. 1, 2016.

VIEIRA, T. P.; SGARDIOLI, I. C.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L. Genetics and public health: the experience of a reference center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. **Journal of Community Genetics**, Heidelberg, v. 4, n. 1, p. 99–106, 2013.

VOLPE-AQUINO, R. M. *et al.* CranFlow : an application for record-taking and management through the brazilian database on craniofacial anomalies: CranFlow and BDCA. **Birth Defects Research**, Hoboken, v. 110, n. 1, p. 72–80, jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Anthro for personal computers, versão 3.2.2, 2011**: software for assessing growth and development of the world's children. Geneva, 2010.- Disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>. Acesso em: 12 out. 2018.