



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Camila Maia Costa de Queiroz Souto

**Caracterização clínica e molecular de famílias com Hiperplasia Adrenal
Congênita no Sistema Único de Saúde em Alagoas**

Maceió
2023

CAMILA MAIA COSTA DE QUEIROZ SOUTO

Caracterização clínica e molecular de famílias com Hiperplasia Adrenal Congênita no Sistema Único de Saúde em Alagoas

Dissertação (Mestrado) apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: estudos clínicos e laboratoriais em ciências médicas

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí

Coorientadoras: Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó

Profa. Dra. Débora de Paula Michelatto

Maceió
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S728c Souto, Camila Maia Costa de Queiroz.

Caracterização clínica e molecular de famílias com hiperplasia adrenal congênita no Sistema Único de Saúde em Alagoas / Camila Maia Costa de Queiroz Souto. – 2023.

98 f. : il.

Orientador: Reginaldo José Petrolí.

Co-orientadora: Isabella Lopes Monlleó.

Co-orientadora: Débora de Paula Michelatto.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 58-63.

Apêndices: f. 64-78.

Anexos: f. 79-98.

1. Sistema Único de Saúde (Brasil). 2. Triagem neonatal. 3. Efeito fundador.
I. Título.

CDU: 616-007.61:614(813.5)

Folha de Aprovação

Camila Maia Costa de Queiroz Souto

Caracterização clínica e molecular de famílias com Hiperplasia Adrenal Congênita no Sistema Único de Saúde em Alagoas

Dissertação submetida ao exame de defesa em nível de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas em 14 de novembro de 2023

Documento assinado digitalmente



REGINALDO JOSE PETROLI
Data: 21/12/2023 16:02:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Reginaldo José Petrolí
PPGCM/FAMED/UFAL
Orientador

Documento assinado digitalmente



ISABELLA LOPES MONLLEO
Data: 22/12/2023 14:19:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Isabella Lopes Monlleó
PPGCM/FAMED/UFAL
Coorientadora

Documento assinado digitalmente



DEBORA DE PAULA MICHELATTO
Data: 21/12/2023 16:43:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Débora de Paula Michelatto
FAMED/UFAL
Coorientadora

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente



AUXILIADORA DAMIANNE PEREIRA VIEIRA DA CO
Data: 23/12/2023 14:48:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Auxiliadora Damianne Pereira Vieira da Costa e Silva
PPGCM/FAMED/UFAL
Examinadora interna



Documento assinado digitalmente

JULIANA CELIA DE FARIAS SANTOS

Data: 22/12/2023 14:55:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Célia de Farias Santos
PPGCM/FAMED/UFAL
Examinadora interna



Documento assinado digitalmente

FERNANDA CAROLINE SOARDI

Data: 22/12/2023 14:44:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fernanda Caroline Soardi
UFMG
Examinadora externa

Aos pequenos herdeiros de parte da minha genética, Marcos e Isabela,
pelo amor e força que me fazem levantar todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e suas famílias, sem os quais esse estudo não seria possível, meus mais sinceros agradecimentos. Vocês foram meus mestres desde a minha formação como médica e os responsáveis por despertar em mim a vontade de querer ser melhor para fornecer a vocês a melhor assistência que posso.

Ao meu orientador, professor Reginaldo, pela paciência e compreensão comigo durante este ciclo. Sei que não fui uma orientanda fácil, mas agradeço por não ter desistido de mim. Obrigada por me conduzir nessa estrada longa e, por vezes, tortuosa, para que eu conseguisse concluí-la, apesar das tantas vezes que pensei em desistir.

À minha coorientadora Débora, que foi um presente nesta etapa da minha vida, academicamente falando pela didática, fluidez de pensamentos, objetividade, mas acima de qualquer academicismo, pela pessoa que me enxergou como ser humano, com falhas e fraquezas (muitas, inclusive), mas que me abraçou (às vezes literalmente) e acreditou em mim desde o início. Muito obrigada, de coração, professora, por todas as mãos que me estendeu quando caí e por todo o reforço positivo que me fizeram chegar aqui hoje.

À minha coorientadora Isabella, que sempre acolheu minhas ideias desde 2011 quando entrei para o grupo de pesquisa em DDS na faculdade e que, ao longo desses 12 anos, tornou-se mais do que uma referência em ensino e pesquisa, mas uma amiga querida, de olhar terno e abraço quentinho, que aquece a alma e motiva a gente a querer ir atrás do que for necessário para que tudo dê certo no final. Não tenho como agradecer por todos esses anos de aprendizado, amizade, compreensão, carinho, paciência (e muita!) e inspiração. É uma honra e privilégio poder trabalhar com você. Obrigada por me enxergar como eu sou, por me deixar chorar quando preciso, por me dar tempo, por me receber de volta quando saio correndo, por não desistir de mim.

Ao meu amado mestre, com carinho, professor Guilherme Gaelzer, minha inspiração de docência. Seguir este caminho acadêmico tem culpa sua, professor. Porque ao final de cada aula de genética médica, eu sempre queria me levantar e aplaudir; porque sua fala mansa e baixinha conseguia me prender do início ao fim de cada aula; porque a docência e a arte tinham uma simbiose inexplicável sob sua regência e eu passei a querer isso pra mim também, com expectativa de ser pelo menos $\frac{1}{4}$ do que o senhor foi em sala de aula. Obrigada não só pela inspiração, mas pelo carinho que sempre teve comigo.

Aos amigos que o mestrado me deu, Mariana e Virgílio, meus procrastinators, hoje já mestres. Como seria minha vida de mestrandia sem o apoio de vocês? Obrigada por me

ajudarem, pelas risadas, pelos planos mirabolantes durante as disciplinas, por escutarem minhas lamúrias e me abraçarem nesse processo.

À toda a equipe do CBMEG, LGMH e LCH que possibilitaram os exames necessários para que chegássemos aos resultados desse estudo.

À Casa do Pezinho por me receber e me fornecer espaço para aplicação dos protocolos com os pacientes triados.

Aos meus amigos de trabalho do Hospital da Criança e do Hospital Geral do Estado, que me estimulam e me ensinam a ser uma pessoa melhor, pelas terapias diárias grátis, pelas risadas, perrengues, por tornar meus dias mais amenos, e, durante essa jornada de mestrado, por me incentivarem todos os dias.

Aos meus amigos de infância que perduram até hoje, a vocês serei eternamente grata pela infância saudável que me fez chegar a idade adulta sã e com visão crítica, sem nunca faltar cuidado e carinho. Obrigada pela torcida, meus amores.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para me deixar a educação como legado de vida, pelo amor e carinho desde o início da minha concepção. Hoje não posso compartilhar esse momento com meu pai, Marcos, mas você vive em mim, pai, e minha mãe, Isabel, segue cuidando da gente com amor e dedicação. Ao meu irmão pela amizade e parceria, pelo cuidado e carinho.

Ao meu maior apoiador e melhor suporte do mundo, meu marido Leandro, quem eu escolhi para ser meu companheiro de aventuras. A pessoa que está sempre ao meu lado nos bons e maus momentos, que não me deixa cair, que me sorri sem esperar sorriso de volta, que me ama mesmo quando não mereço, que me deu a honra de ser mãe do Marquinhos e agora, em futuro breve, da Belinha. Obrigada, meu amor. Só você sabe o quão difícil foi para eu chegar até aqui. E se cheguei, foi graças a você.

Ao melhor filho que uma mãe poderia sonhar, meu pequeno Marcos, minha força, meu amor, minha vida, meu tudo. E a você, pequena e ainda não nascida Isabela, minha filha, que desde já me impulsiona a querer um mundo melhor pra você e seu irmão.

A todos que contribuíram para que esta pesquisa fosse para a frente e que eu não errasse o caminho até aqui, muito obrigada! Foi intenso, avassalador, uma experiência sem igual.

*If you're going to try,
go all the way.
Otherwise, don't even start.*

Charles Bukowski

RESUMO

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) por deficiência da 21-hidroxilase (21OHD) é um erro inato do metabolismo autossômico recessivo. A forma clínica depende do grau de atividade residual da 21-hidroxilase (21OH). A HAC-21OHD foi incorporada ao Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) no Brasil em 2012 e implementada no Sistema Único de Saúde de Alagoas (SUS-AL) em 2016, sendo os pacientes referenciados ao Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) na Casa do Pezinho. Antes do PNTN, desde 2008, os indivíduos afetados do SUS-AL vem sendo acompanhados no ambulatório multidisciplinar de Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo (DDS) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas. Ambos os serviços são referência no atendimento de pacientes com HAC-21OHD no SUS-AL. O estudo tem como objetivo descrever o perfil clínico-molecular da HAC-21OHD no SUS-AL, a partir da composição de um banco de dados único. Para isso, foram incluídos pacientes atendidos de 03/2008 a 02/2022 em ambos os serviços, com diagnóstico clínico-laboratorial de HAC-21OHD. Dados foram coletados dos prontuários e laudos da análise molecular do gene *CYP21A2*. Foi realizada análise descritiva da amostra, com distribuição de frequência e medidas de tendência central e dispersão. O banco de dados foi composto por 45 pacientes distribuídos em 40 famílias, a maioria proveniente do interior de AL (75.0%) e 19.5% relataram consanguinidade. A idade na 1ª consulta variou de 4 dias de vida a 34 anos e 72.7% apresentaram ambiguidade genital. A forma Clássica Perdedora de Sal (CL-PS) foi a mais frequente sendo a variante c.290-13A/C>G mais prevalente, seguida pela p.Ser170Lisfs*125. Uma nova variante patogênica p.Ser301Pro foi identificada. Quatro pacientes foram a óbito por crise adrenal, um deles, triado pelo PNTN, foi a óbito antes da divulgação do resultado. Os dados aqui apresentados estão em conformidade com a literatura, onde a forma CL-PS é mais frequente, com maior prevalência da variante c.290-13A/C>G. Entretanto, a alta frequência da variante p.Ser170Lisfs*125, considerada rara, fornece indícios de possível efeito fundador. Se faz evidente a necessidade de descentralização dos serviços para o interior do estado. Os óbitos por crise adrenal reduziram substancialmente, porém ainda há necessidade de melhora no fluxo do serviço. O reconhecimento dessas características é importante tanto no plano individual quanto no plano coletivo, subsidiando a construção de políticas de saúde específicas para estes pacientes.

Palavras-chave: triagem neonatal, Sistema Único de Saúde, efeito fundador

ABSTRACT

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21OHD) is an inborn error of autosomal recessive metabolism. The clinical form depends on the degree of residual 21-hydroxylase (21OH) activity. CAH-21OHD was incorporated into the National Neonatal Screening Program in Brazil in 2012 and implemented in the Unified Health System of Alagoas (SUS-AL) in 2016, with patients referred to the Neonatal Screening Reference Service at Casa do Pezinho. Before the National Neonatal Screening Program, since 2008, affected individuals from SUS-AL have been monitored at the multidisciplinary Disorders of Sex Development outpatient clinic at the University Hospital of the Federal University of Alagoas. Both services are a reference in the care of patients with CAH-21OHD in SUS-AL. The study aims to describe the clinical-molecular profile of CAH-21OHD in SUS-AL, based on the composition of a unique database. For this, patients treated from 03/2008 to 02/2022 in both services, with a clinical-laboratory diagnosis of CAH-21OHD, were included. Data were collected from medical records and molecular analysis reports of the *CYP21A2* gene. A descriptive analysis of the sample was carried out, with frequency distribution and measures of central tendency and dispersion. The database was composed of 45 patients distributed in 40 families, the majority from the countryside of AL (75.0%) and 19.5% reported consanguinity. The age at the first consultation ranged from 4 days of age to 34 years and 72.7% had genital ambiguity. The Salt-Wasting Classic Form (SW-CL) was the most common, with the c.290-13A/C>G variant being the most prevalent, followed by p.Ser170Lisfs*125. A novel-variant p.Ser301Pro was identified. Four patients died due to adrenal crisis, one of them, screened by the National Neonatal Screening Program, died before the result was released. The data presented here are in accordance with the literature, where the SW-CL form is more frequent, with a higher prevalence of the c.290-13A/C>G variant. However, the high frequency of the p.Ser170Lisfs*125 variant, considered rare, provides evidence of a possible founder effect. The need to decentralize services to the countryside of the state is evident. Deaths due to adrenal crisis have reduced substantially, but there is still a need to improve the flow of the service. The recognition of these characteristics is important both at the individual and collective levels, supporting the construction of specific health policies for these patients.

Keywords: neonatal screening, Brazilian Unified Health System, founder effect

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Modificação da nomenclatura e suas respectivas classificações.....	21
Tabela 2 - Determinação do fenótipo de acordo com as alterações patogênicas.....	27
Figura 1 - Cascata da esteroidogênese adrenal.....	22
Figura 2 - Mecanismo de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise-adrenais para a regulação da produção hormonal.....	23
Figura 3 – Escala de Prader.....	24
Figura 4 - Localização do <i>CYP21A2</i> e de seu pseudogene.....	26
Figura 5 - Correlação genótipo-fenótipo em HAC pela deficiência da <i>CYP21A2</i> baseado na atividade enzimática apresentada in vitro.....	26
Figura 6 - Composição do banco de dados único de HAC-21OHD em Alagoas no SUS.....	30
Figura 7 - Classificação de Quigley.....	31
Figura 8 - Estadiamento Puberal de Tanner.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17OHP	17-hidroxiprogesterona
21OH	21-hidroxilase
21OHD	Deficiência da 21-hidroxilase
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DDS	Distúrbio/Diferença do Desenvolvimento do Sexo
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
HGMD	Human Gene Mutation Database
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
LCH	Laboratório de Citogenética Humana
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
MESM	Maternidade Escola Santa Mônica
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
NC	Não Clássica
PCR-AE	Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específico
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PPSUS	Programa de Pesquisa para o SUS
PS	Perdedora de Sal
SGC	Serviço de Genética Clínica
SRTN	Serviço de Referência de Triagem Neonatal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VS	Virilizante Simples

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4 METODOLOGIA	28
4.1 Delineamento do estudo e composição da amostra	28
4.2 Coleta dos dados	29
4.3 Ensaio laboratoriais	31
4.3.1 <i>Investigação do sexo citogenético</i>	31
4.3.2 <i>Rastreamento de alterações patogênicas do gene CYP21A2</i>	31
4.4 Tabulação e análise dos dados	32
5 PRODUTOS	33
5.1 Produtos Finalizados.....	34
5.1.1 <i>Clinical and molecular epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in two reference Brazilian services</i>	34
5.1.2 <i>Banco de dados unificado dos casos de HAC dos dois serviços de referência no SUS em Alagoas</i>	49
5.2 Produtos propostos.....	51
5.2.1 <i>Artigo em andamento sobre a variante nova - Severe Congenital Adrenal Hyperplasia in several members of a consanguineous family: a novel CYP21A2 pathogenic variant</i>	51

5.2.2 Artigo sobre a variante rara e o possível efeito fundador - <i>High prevalence of an uncommon CYP21A2 pathogenic variant in Alagoas</i>	53
6 CONCLUSÕES.....	54
7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	64
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	64
APÊNDICE B - Protocolo genético-clínico do ambulatório DDS.....	70
APÊNDICE C – Arquivo suplementar do artigo <i>Clinical and molecular epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in two reference Brazilian services</i>	78
ANEXOS.....	79
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	79
ANEXO B – Normas para envio de manuscrito – Jornal de Pediatria.....	87

1. INTRODUÇÃO

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) é um Distúrbio/Diferença do Desenvolvimento do Sexo (DDS) autossômico recessivo, decorrente da deficiência de qualquer uma das enzimas que participam da esteroidogênese adrenal, levando a alterações na biossíntese de mineralocorticoides, glicocorticoides e andrógenos. Variantes no gene *CYP21A2* que causam deficiência da 21-hidroxilase (21OH) - uma das enzimas que atuam na via de produção das três classes de esteróides adrenais - respondem pela maioria dos casos de HAC (MERKE, DP; AUCHUS, RJ, 2020; EL-MAOUCHE, D; ARLT, W; MERKE, DP, 2017).

Os diferentes fenótipos da HAC por deficiência da 21OH (21OHD) refletem a atividade residual enzimática. A perda significativa desta atividade relaciona-se à forma clássica e, quando o prejuízo é brando, à forma não clássica. Estima-se que a forma clássica ocorra em 1:15.000 nascidos, o que a torna a maior causa de ambiguidade genital e morte neonatal por perda de sal (NERMOEN, I et al, 2017; MICHELATTO, D.P., 2016).

O diagnóstico laboratorial é dado pela elevação da 17-hidroxiprogesterona (17OHP), metabólito precursor da ação da 21OH. Faz-se necessária uma rápida suspeição diagnóstica devido ao risco de crise adrenal, especialmente em recém-nascidos 46,XY que por não apresentarem ambiguidade genital, têm elevada mortalidade. Em todos os casos, é necessário seguimento por equipe multidisciplinar para manejo e suporte aos pais e pacientes (Lemos-Marini SHV, Mello MP, 2019; MERKE, DP; AUCHUS, RJ, 2020).

Em 2008, para fazer frente ao atendimento fragmentado aos pacientes com DDS no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA/UFAL) (ZANOTTI, S.V.; MONLLEÓ, I.L, 2012), foi criado o ambulatório integrado de genética e psicanálise no Serviço de Genética Clínica (SGC/HUPAA/UFAL) (GAZZANEO, IFP, 2016).

Mantido por 10 anos como cenário de ensino e pesquisa em DDS, atualmente este ambulatório está incorporado à rotina do SGC/HUPAA/UFAL e conta com o suporte de um grupo multidisciplinar formado por geneticistas, psicólogos, enfermeira, bioeticista, endocrinologista, cirurgião pediátrico, biólogos e biomédico. Recentemente o SGC/HUPAA/UFAL passou a oferecer diagnóstico molecular para crianças com suspeita de HAC-21OHD. Esse diagnóstico é importante para a correlação genótipo-fenótipo, contribuindo de forma essencial para a avaliação do prognóstico e para o aconselhamento genético que é oferecido não só ao núcleo familiar, mas a todos os parentes interessados.

Em 2012 o governo do Brasil incluiu a HAC-21OHD no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). O PNTN oferece a dosagem da 17OHP pelo teste do pezinho e o acompanhamento multidisciplinar dos casos positivos. Alagoas implantou este rastreio em 2016 na Casa do Pezinho (Serviço de Referência de Triagem Neonatal - SRTN) que está vinculada à Maternidade Escola Santa Mônica - Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (MESM/UNCISAL), na capital do Estado.

A Casa do Pezinho e o ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL compõem as principais fontes de dados sobre a HAC-21OHD em Alagoas. Até o momento, o intercâmbio entre essas duas frentes de atendimento tem sido eventual e informal.

Diante do exposto, a presente dissertação, que constituiu parte importante do projeto *Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar* pelo Programa de Pesquisas para o SUS - PPSUS (2021-2023), objetivou sistematizar e descrever as características sociodemográficas, clínicas e genéticas de famílias com HAC-21OHD atendidas nas duas instituições a partir da constituição de um banco de dados único e da realização de diagnóstico molecular para todos os recém-nascidos triados pelo PNTN.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Descrever as características epidemiológicas, clínicas e genéticas de famílias com HAC atendidas no SGC/HUPAA/UFAL e no SRTN de Alagoas.

2.2. Objetivos específicos

- Compor um banco de dados único dos pacientes com HAC acompanhados nas duas instituições;
- Investigar as alterações patogênicas do gene *CYP21A2* e sua distribuição geoespacial em Alagoas;
- Correlacionar a apresentação clínica às alterações moleculares encontradas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

DDS - classificação

O avanço na identificação de causas genéticas moleculares no desenvolvimento anormal da diferenciação sexual, além de melhor conscientização ética, foi fundamental para uma mudança de nomenclatura da condição, em defesa do paciente, ocorrida em 2006, a partir de uma revisão do tema pela *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* e pela *European Society for Paediatric Endocrinology*, manifesta como Consenso de Chicago. Conhecidas como Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo (DDS), estas são condições congênitas em que o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal ou anatômico é atípico (LEE, P.A. *et al*, 2006; HUGHES, I.A. *et al*, 2005). A tabela abaixo traz a nomenclatura revista proposta.

Nomenclatura Prévia	Nomenclatura Proposta
Intersexo	Distúrbios do Desenvolvimento do Sexo (DDS)
Pseudohermafroditismo masculino	
Subvirilização do homem XY	DDS 46,XY
Submasculinização do homem XY	
Pseudohermafroditismo feminino	
Supervirilização da mulher XX	DDS 46,XX
Masculinização da mulher XX	
Hermafroditismo verdadeiro	DDS ovotesticular
Homem XX ou Sexo Reverso XX	DDS testicular 46,XX
Sexo Reverso XY	Disgnesia Gonadal Completa 46,XY

Tabela 1: Proposta de modificação da nomenclatura e suas respectivas classificações (traduzida de HUGHES, IA *et al*, 2005)

Ainda que a nova nomenclatura tenha proposto uma maior precisão científica dentro de um contexto biológico e médico, promovendo uma classificação abrangente que ajude a gerar modelos de cuidados integrados e que não se sobrepõe a condições como transgênero, disforia de gênero e homossexualidade, a nomenclatura não foi bem aceita entre alguns grupos de apoio, devido ao estigma do termo “distúrbio”, sendo melhor aceito o termo “diferenças”. Alguns ainda defendem o termo “intersexo” para bebês que necessitam de designação masculina ou feminina. (LEE, P.A.; NORDENSTRÖM, A.; HOUK, C.P. *et al*, 2016).

Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC)

Dentro do grande grupo de DDS, a HAC é a condição mais prevalente. Trata-se de um erro inato do metabolismo de etiologia autossômica recessiva em que a deficiência de uma das sete enzimas que participam da esteroidogênese nas adrenais (Figura 1) levam a desbalanços hormonais (EL-MAOUCHE, D.; ARLT, W.; MERKE, D.P., 2017; LEMOS-MARINI, S.H.V; MELLO, M.P., 2019).

As adrenais são responsáveis pela produção de esteroides a partir do colesterol, através de uma cascata complexa dependente de enzimas funcionais para que a biossíntese dos esteroides aconteça (MERKE, D.P.; BORNSTEIN, S., 2005).

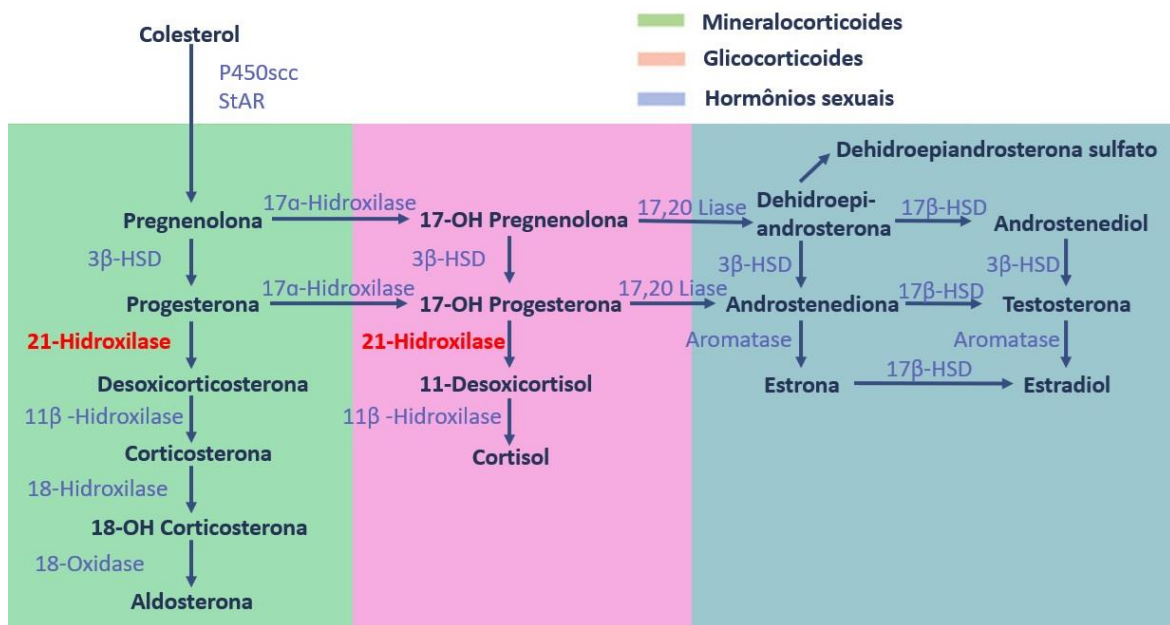


Figura 1: Cascata da esteroidogênese no córtex da adrenal. Versão adaptada em português da imagem disponível em https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-the-adrenal-steroidogenesis-biosynthesis-pathway-HSD-hydroxysteroid_fig2_311630533

O quadro clínico da HAC é bastante variado, visto que depende da enzima que está disfuncional e do grau de deficiência enzimática. Como a deficiência da 21-hidroxilase (21OH) responde por mais de 95% de todos os casos de HAC, este trabalho se limitará a abordar a HAC por deficiência da 21OH (MERKE, D.P.; BORNSTEIN, S., 2005; EL-MAOUCHE, D.; ARLT, W.; MERKE, D.P., 2017; MERKE, D.P.; AUCHUS, RJ, 2020).

HAC por deficiência da 21OH

Em 95 a 99% dos casos de HAC, variantes no gene *CYP21A2* são responsáveis por causar diferentes graus de deficiência na enzima 21OH, causando prejuízos nos produtos finais das vias dos glicocorticóides e dos mineralocorticóides. Com a interrupção total ou parcial da

cascata pela enzima disfuncional, haverá o acúmulo dos metabólitos precursores ao bloqueio, provocando um desvio de produção para a via dos esteróides sexuais, que se acumularão em níveis acima do fisiológico (MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020; WITCHEL, S.F., 2017; TURCU, A.F.; AUCHUS, R.J., 2015).

A cadeia da esteroidogênese da adrenal é regulada por meio de um sistema de *feedback* negativo (figura 2). Os níveis circulantes de cortisol no sangue inibem a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo. Com a deficiência enzimática, a cascata de produção hormonal das adrenais, a biossíntese do cortisol é afetada, fazendo com que sua produção seja reduzida. A redução dos níveis de cortisol circulantes, estimula o aumento da secreção do ACTH na tentativa de incitar a produção do cortisol, provocando, como consequência, a hiperplasia funcional das células da adrenal devido ao estímulo crônico (TURCU, A.F.; AUCHUS, R.J., 2015; WITCHEL, S.F., 2017; LEMOS-MARINI, S.H.V; MELLO, M.P., 2019).

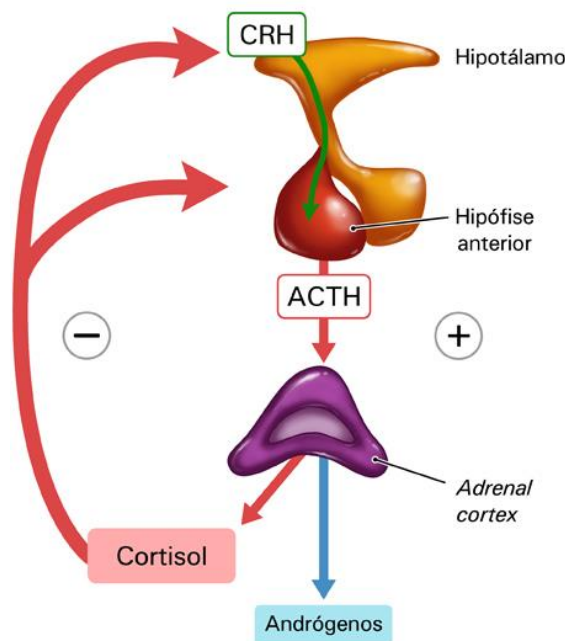


Figura 2: Mecanismo de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise-adrenais para a regulação da produção hormonal.

Disponível

em:

https://midia.atp.usp.br/impressos/redefor/EnsinoBiologia/Fisio_2011_2012/Fisiologia_v2_semana07.pdf

Apresentação clínica

O quadro clínico pode variar desde manifestações mais precoces, já ao nascimento ou primeira infância, até formas mais leves de apresentação mais tardia, na idade adulta. Esta variação é devida aos diferentes graus de atividade residual da 21OH. Clinicamente, a HAC é

classificada em forma clássica, onde a deficiência enzimática é maior, e forma não clássica, também conhecida por início tardio (NIMKARN, S. *et al*, 2016; MICHELATTO, D.P., 2016).

A forma clássica tem incidência mundial estimada em 1:10000 a 1:20000 e pode ser subdividida em forma clássica perdedora de sal (CL-PS) e forma clássica virilizante simples (CL-VS). A HAC CL-PS é a forma mais grave da deficiência da 21OH em que, além da deficiência na biossíntese de cortisol, a aldosterona não é produzida em níveis fisiológicos adequados o que resultará no desequilíbrio homeostático corporal levando o indivíduo a crises de perda de sal, podendo ser evidenciadas já na primeira semana de vida por quadro de vômitos, desidratação e baixo ganho ponderal. (MARINO, S. *et al*, 2020; MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020). Se a crise adrenal não for identificada e tratada em tempo hábil, pode progredir rapidamente para óbito, sendo considerada a maior causa de óbito neonatal de causa endocrinológica (NERMOEN, I. *et al*, 2017). Já na HAC CL-VS, a síntese de aldosterona, ainda que afetada, não se apresenta em níveis alarmantes que gerem repercussões clínicas. Tanto na forma CL-PS quanto na forma CL-VS o embrião é exposto intra útero a altos níveis sistêmicos de andrógenos adrenais o que resultará em virilização da genitália externa dos fetos 46,XX que apresentarão genitália ambígua ao nascimento e sinais de puberdade precoce nos indivíduos 46,XY (MARINO, S. *et al*, 2020; MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020).

Os diferentes graus de ambiguidade genital percebidas ao nascimento são classificadas de acordo com a escala Prader (Figura 3). Esta escala de virilização da genitália externa foi proposta em 1954 pelo endocrinologista pediátrico suíço Andrea Prader e é utilizada até os dias de hoje para definir objetivamente marcos clínicos que apontam diferentes estágios de virilização (PRADER, A.; GURTNER, H.P., 1955; MAKIYAN, Z., 2016).

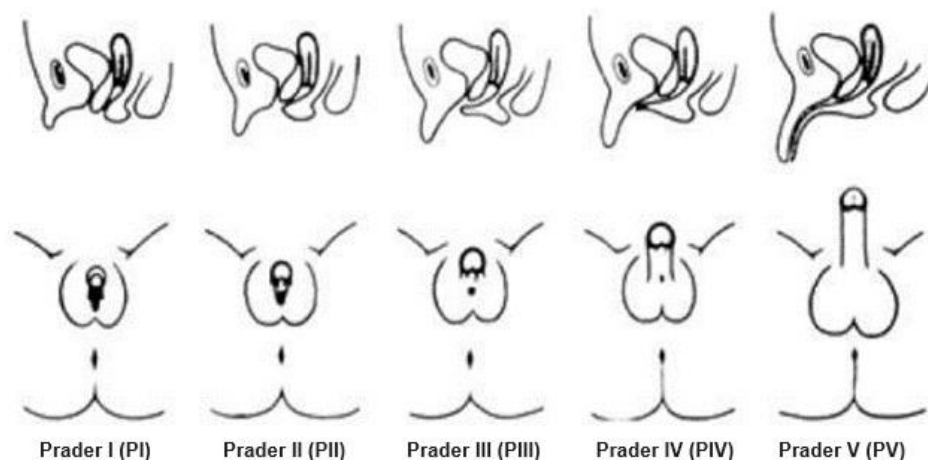


Figura 3: Escala de Prader demonstrando diferentes graus de virilização da genitália externa, do menos virilizado (Prader I) até o mais virilizado (Prader 5). De acordo com a descrição proposta para cada estágio, Prader propôs: **Prader I** - aumento isolado do clitóris; **Prader II** - aumento do clitóris associado a um intróito vaginal em forma de funil, podendo visualizar-se aberturas uretral e vaginal distintas; **Prader III** - aumento de clitóris associado a

um intróito profundo, em forma de funil, com a uretra esvaziando-se na vagina, como um pseudo seio urogenital; **Prader IV** - clitóris fálico com abertura urogenital em forma de fenda na base do falo; **Prader V** - fusão lábio-escrotal completa e uretra peniana.

A HAC forma não clássica (HAC NC) é considerada menos grave devido ao bloqueio parcial da atividade enzimática. Esta forma é muito mais comum no mundo, com uma prevalência estimada de 1:200 a 1:1000 casos. Prevalências mais altas foram relatadas em populações judaicas, mediterrâneas, do Oriente Médio e da Índia. (WITCHEL, S.F.; AZZIZ, R., 2010). Achados clínicos na HAC NC geralmente começam a partir dos 5 anos de idade, podendo surgir no final da infância, adolescência ou vida adulta. Os achados clínicos incluem fusão labial genital, clitoromegalia isolada, rápido crescimento do pênis em meninos pré-púberes, pubarca precoce, aceleração do crescimento com baixa estatura final, hirsutismo, amenorreia ou ciclos anovulatórios, podendo ser uma das etiologias da síndrome dos ovários policísticos, abortos de repetição e infertilidade. Entretanto esta variação e sua prevalência podem ser ainda maiores considerando a existência de indivíduos assintomáticos (KURTOĞLU, S.; HATIPOĞLU, N., 2017).

A enzima 21OH e o Gene *CYP21A2*

A 21OH é codificada pelo gene *CYP21A2*, localizado no braço curto do cromossomo 6 (localização cromossômica 6p21.3), inserido no complexo principal de histocompatibilidade humana HLA classe III (Figura 4). Este gene possui uma cópia quase idêntica, o pseudogene *CYP21A1P*. Ambos possuem 10 éxons, e uma homologia de 98% nos éxons e 96% nos íntrons entretanto, o *CYP21A1P* é considerado um pseudogene devido às diversas variantes deletérias que o tornam inativo (MELLO, M.P. *et al*, 2002; MICHELATTO, D.P., 2016). Mais de 300 variantes patogênicas relacionadas a HAC por deficiência da 21OH já foram descritas (*Human Gene Mutation Database*), no entanto, a maioria dos pacientes diagnosticados possuem sequências deletérias derivadas do pseudogene (MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020). As 10 alterações patogênicas mais frequentes derivadas do pseudogene *CYP21A1* e as suas localizações estão representadas na Figura 4.

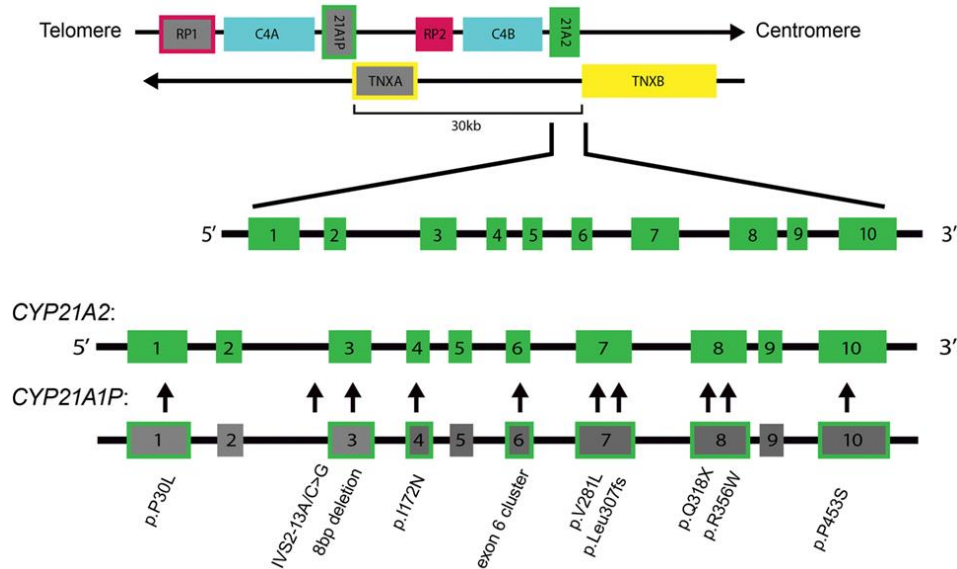


Figura 4: Representação da região do complexo HLA classe III, no cromossomo 6, demonstrando a localização do *CYP21A2* e de seu pseudogene, bem como de suas principais variantes patogênicas.

Genótipo x Fenótipo

Ao longo dos anos, investigações *in vitro* têm sido realizadas para se determinar o efeito biológico das alterações identificadas no gene *CYP21A2* sobre a expressão e atividade enzimática da 21OH. Assim, com base nas atividades residuais e por analogia às formas clínicas, as alterações patogênicas no gene *CYP21A2* são classificadas em: a) perdedora de sal (atividade residual enzimática = 0 ou $\leq 1\%$); b) virilizante simples (atividade residual enzimática entre 1-5%); e c) não clássica (atividade residual enzimática $\geq 10\%$) (Figura 5) (MICHELATTO, D.P., 2016).

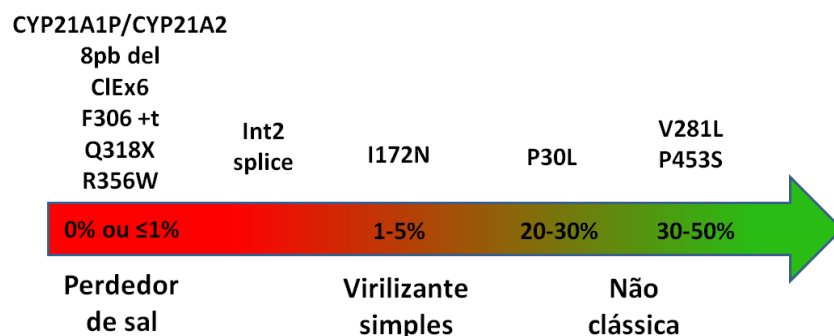


Figura 5: Correlação genótipo-fenótipo em HAC pela deficiência da *CYP21A2* baseado na atividade enzimática apresentada *in vitro*. Adaptado de (Krone & Arlt, 2009).

Diferentemente da maioria das condições clínicas de padrão de herança autossômica recessiva, a consanguinidade parental não tem relevância significativa na HAC, dada a elevada frequência populacional de algumas variantes, chegando a 1:60. Desta forma, é grande a

probabilidade de ocorrer um filho afetado de pais não aparentados, com duas variantes diferentes nos dois alelos, conhecidos como heterozigotos compostos. O fenótipo esperado de indivíduos heterozigotos compostos pode ser deduzido pela alteração patogênica que determinar o menor dano à atividade enzimática (Quadro 1) (MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020; HANNAH-SHMOUNI, F., CHEN, W., MERKE, D.P., 2009).

GENÓTIPO ENCONTRADO	FENÓTIPO ESPERADO
2 Alterações graves	HAC CL-OS
1 Alteração intermediária + 1 Alteração grave	HAC CL-VS
2 Alterações intermediárias	
1 Alteração branda + 1 Alteração grave	HAC NC
1 Alteração branda + 1 Alteração intermediária	
2 Alterações brandas	

Tabela 2: Determinação do fenótipo de acordo com as alterações patogênicas. Alterações graves = atividade residual enzimática = 0 ou $\leq 1\%$; Alterações intermediárias = atividade residual enzimática entre 1-5%; Alterações brandas = atividade residual enzimática $\geq 10\%$

A correlação entre a apresentação clínica e a gravidade da alteração patogênica discutida na maioria dos estudos é geralmente concordante, mas a distinção entre as formas virilizante simples, perdedora de sal e não clássica não é absoluta, uma vez que muitos pacientes com alterações no *CYP21A2* não se enquadram neste padrão (KRONE, N. *et al*, 2000; NIMKARN, S. *et al*, 2016). Um exemplo frequente é observado em pacientes que apresentam homozigose da variante c.290-13A/C>G, considerada uma alteração grave, portanto determinando o fenótipo perdedor de sal. Entre pacientes com esse genótipo, podem ser encontrados também aqueles com fenótipo virilizante simples. Uma possível explicação é que a troca c.290-13A/C>G deixa o sítio normal inalterado. Portadores dessa alteração podem produzir um mRNA processado corretamente, sendo possível a síntese de uma pequena quantidade de enzima funcional, suficiente para manifestar-se fenotipicamente de maneira menos grave (KOCOVA, M; CONCOLINO, P; FALHAMMAR, H, 2022).

A confirmação por testes moleculares não são indispensáveis ao diagnóstico de HAC, mas tem grande relevância nos casos duvidosos, para descartar a doença em pacientes assintomáticos com valores persistentemente elevados, diminuindo o tempo de acompanhamento desnecessário, diferenciar formas CL-PS e CL-VS em pacientes triados que não apresentem crise adrenal, reduzindo o uso desnecessário de mineralocorticóides, além de garantir um aconselhamento genético de qualidade, fornecendo informações completas às

famílias envolvidas no planejamento de futuros filhos (LEMOS-MARINI, S.H.V.; MELLO, M.P., 2019; SPEISER, P.W. *et al*, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2019).

Diagnóstico bioquímico e triagem neonatal (teste do pezinho)

O diagnóstico de HAC é baseado na dosagem sérica de 17-hidroxiprogesterona (17OHP), esteróide precursor do bloqueio enzimático, que estará em níveis acima de 100 ng/ml (10.000 ng/dL). Embora medições aleatórias do esteróide possam ser elucidativas, a dosagem dos metabólitos após teste de estímulo com ACTH deve ser realizada para diferenciar a HAC por deficiência de outras enzimas (SPEISER, P.W. *et al*, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2019). Além disto, na forma CL-PS, o diagnóstico laboratorial pode ser complementado com evidência de hiponatremia, hipercalemia, hipoglicemia e elevação da renina plasmática (LEMOS-MARINI, S.H.V.; MELLO, M.P., 2019).

A dosagem de 17OHP é um teste de baixo custo, capaz de identificar as formas clássicas, sendo amplamente utilizada para fins diagnósticos. Por estar elevada já nos primeiros dias de vida do recém-nascido, é o teste de escolha para rastreio de HAC nos programas de triagem neonatal mundo afora, antes mesmo do início das perdas salinas (WHITE, P.C., 2009).

A triagem neonatal da HAC, forma clássica, começou em 1977 no Alasca, estando atualmente vigente em todo o território dos Estados Unidos e em mais de 40 países incluindo o Brasil (WHITE, P.C., 2009; MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020).

A Triagem Neonatal Biológica (TNB) é um conjunto de ações preventivas, responsável por identificar precocemente indivíduos com doenças metabólicas, genéticas, enzimáticas e endocrinológicas, para que estes possam ser tratados em tempo oportuno, evitando as sequelas e até mesmo a morte. Além disso, propõe o gerenciamento dos casos positivos através de monitoramento e acompanhamento da criança durante o processo de tratamento (BRASIL, 2022).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) implantou a TNB, conhecida como Teste do Pezinho em 2001, com duas doenças elegíveis para a triagem e programação de inserção gradual de novas condições através de fases no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). A HAC foi incluída na fase IV do programa através da Portaria nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012, com universalização da fase em todo o território nacional em 2014. Sob a Portaria nº 280, de 4 de abril de 2014, a fase IV passou a ser incluída na triagem do estado de Alagoas, tendo sido efetivada em 2016, quando o laboratório vinculado ao programa, bem como o Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) passaram a rastrear a HAC através da

coleta da 17OHP em papel filtro e acompanhar os casos triados com equipe multidisciplinar na Casa do Pezinho (BRASIL, 2022; ALAGOAS, 2022).

Manejo e Prognóstico

O tratamento da HAC consiste na reposição de corticóides, a fim de manter níveis séricos fisiológicos que impeçam a manutenção da insuficiência adrenal. Por esta razão, os pacientes e suas famílias devem ser orientados quanto ao uso adequado das medicações, além de situações de estresse e emergência médica que requeiram doses adicionais de hidrocortisona, que é o corticóide de escolha. Além da hidrocortisona, para as formas CL-PS, o mineralocorticóide fludrocortisona deve ser associado ao tratamento, bem como doses adicionais de NaCl à dieta dos lactentes para manutenção fisiológica dos eletrólitos. Corticóides mais potentes e de meia-vida mais longa como prednisona e dexametasona só podem ser utilizados após a puberdade, pelo risco de redução da velocidade de crescimento com consequente baixa estatura final (LEMOS-MARINI, S.H.V.; MELLO, M.P., 2019).

Em crianças com HAC, um importante objetivo adicional da terapia é suprimir a produção de andrógenos derivados da adrenal de forma a permitir o crescimento e desenvolvimento normais e a obtenção da altura adulta normal. Durante a transição para os cuidados na vida adulta, com o término do crescimento linear, o controle do excesso de andrógenos derivados da adrenal é mais brando na tentativa de limitar a exposição a longos períodos de corticoides, devido aos vários efeitos colaterais de médio e longo prazo como osteopenia e hipertensão (MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020).

O tratamento cirúrgico com genitoplastia para os casos de severa virilização da genitália externa deve ser ofertado de maneira precoce, devido a definição psicológica do sexo. Todas as decisões cirúrgicas devem ter prerrogativa das famílias (ou seja, dos pais e do consentimento das crianças mais velhas) na tomada de decisão conjunta com a equipe multidisciplinar. Nos casos de genitálias minimamente virilizadas, deve-se explicar as opções cirúrgicas às famílias, assim como pode ser orientado adiar a cirurgia ou permanecer em observação até que a criança fique mais velha (SPEISER, P.W. *et al*, 2018).

O prognóstico dos casos que iniciam tratamento de maneira precoce costuma ser bom, com preservação da estatura alvo e fertilidade, mantendo qualidade de vida semelhante à da população geral. De todo modo, em todos os casos, as famílias e os pacientes necessitam de acompanhamento com equipe multidisciplinar, pois a condição suscita questões psicológicas importantes relacionadas a definição de sexo (MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J., 2020; LEMOS-MARINI, S.H.V.; MELLO, M.P., 2019).

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento do estudo e composição da amostra

Trata-se de estudo transversal ambispectivo descritivo, com amostra de conveniência, constituída de pacientes com HAC-21OHD atendidos no SGC/HUPAA/UFAL e no SRTN/MESM/UNCISAL desde a incorporação de rotina para atendimento de HAC nestes serviços até fevereiro de 2022. Foram incluídos todos os casos com triagem neonatal positiva ou diagnóstico clínico com elevação da 17OHP.

No período do estudo, 243 pacientes foram atendidos no ambulatório de DDS do HUPAA e 30 pacientes tiveram triagem positiva para HAC no teste do pezinho. Aplicados os critérios de inclusão e exclusão, obteve-se uma amostra de 45 casos que compuseram o banco de dados unificado de HAC em Alagoas (Figura 1).

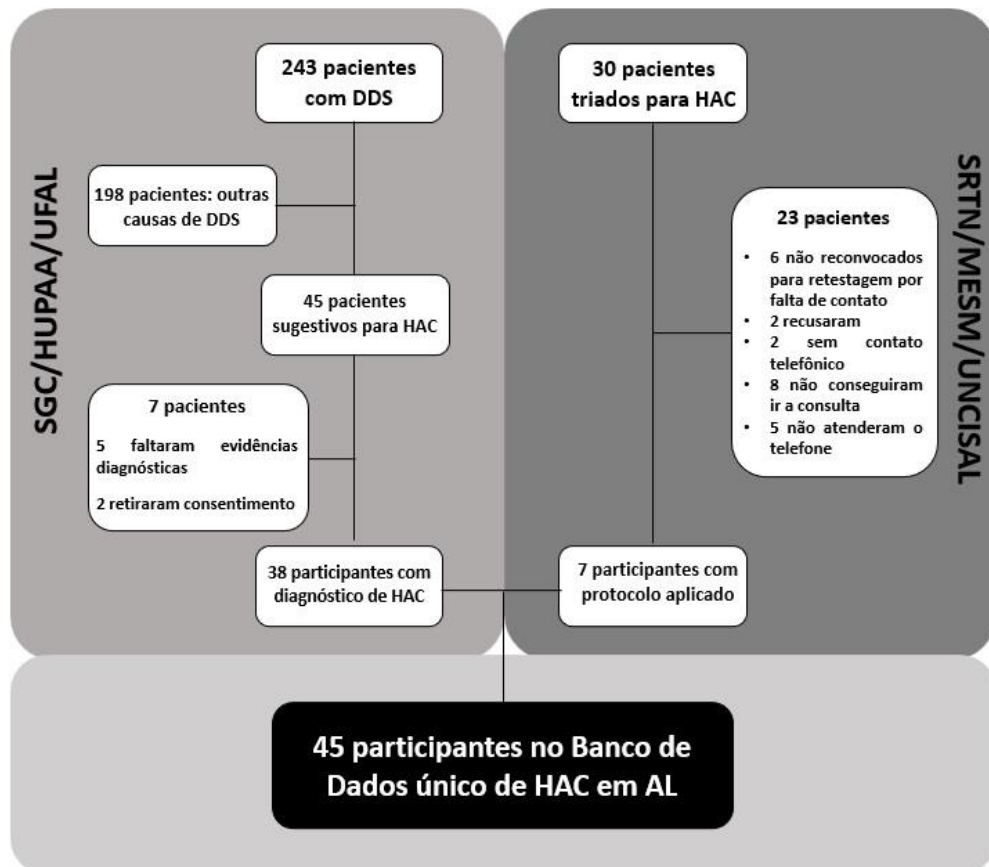


Figura 6: Composição do banco de dados único de HAC-21OHD em Alagoas no SUS.

Todos os integrantes da casuística a partir de março de 2021 (recorte prospectivo) foram convidados a participar após a obtenção do parecer favorável do CEP/UFAL (CAAE 40078620.4.0000.5013; Número do Parecer: 4.598.307 de 18/03/2021) e assinatura do respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice A). O uso dos

dados secundários das pesquisas anteriores (recorte retrospectivo) foi autorizado pelo CEP nesse mesmo protocolo aprovado.

4.2 Coleta dos dados

Os dados clínicos foram colhidos por meio de protocolo único, padronizado desde 2008, que consiste em 21 seções (Apêndice B), compreendendo:

- Informações sociodemográficas: idade, registro civil, sexo atribuído pela família, naturalidade, procedência, naturalidade dos pais, escolaridade dos pais, renda familiar (os três últimos itens foram adicionados na última revisão do protocolo, ocorrida em novembro/2021);
- Informações clínicas: queixas relacionadas a DDS, antecedentes gestacionais e perinatais (uso de testosterona e derivados na gravidez, idade gestacional ao nascimento, realização de teste do pezinho);
- História familiar: consanguinidade parental, recorrência familiar do distúrbio ou ocorrência de outros defeitos congênitos, idade dos pais na concepção, coleta de heredograma com, no mínimo, 3 gerações;
- Exame físico geral: peso, estatura, perímetro cefálico, envergadura e descrição dos achados relacionados a dismorfismos *minor* e *major*;
- Exame físico dirigido: avaliação anatômica da genitália (ambígua, hipoplásica, malformada, aparência normal), classificação de Prader (Figura 3) (DAMIANI et al., 2001) e Quigley (Figura 7) (QUIGLEY et al., 1995) para as ambiguidades genitais, localização do meato uretral, presença de hiperpigmentação genital, comprimento e diâmetro do falo/clitóris/pênis, presença e localização de gônadas, bem como suas medidas quando aplicável, desenvolvimento sexual secundário segundo Tanner (Figura 8) (COUTINHO, 2011), manifestações clínicas associadas;

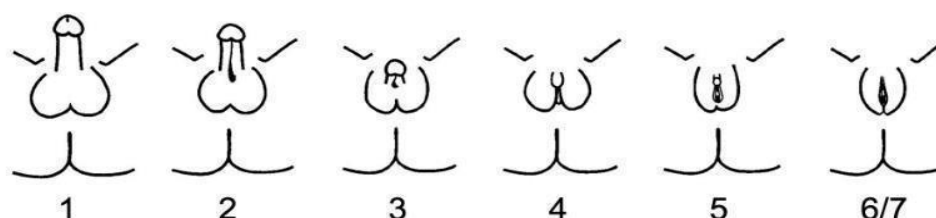


Figura 7: Classificação de Quigley (QUIGLEY et al., 1995)

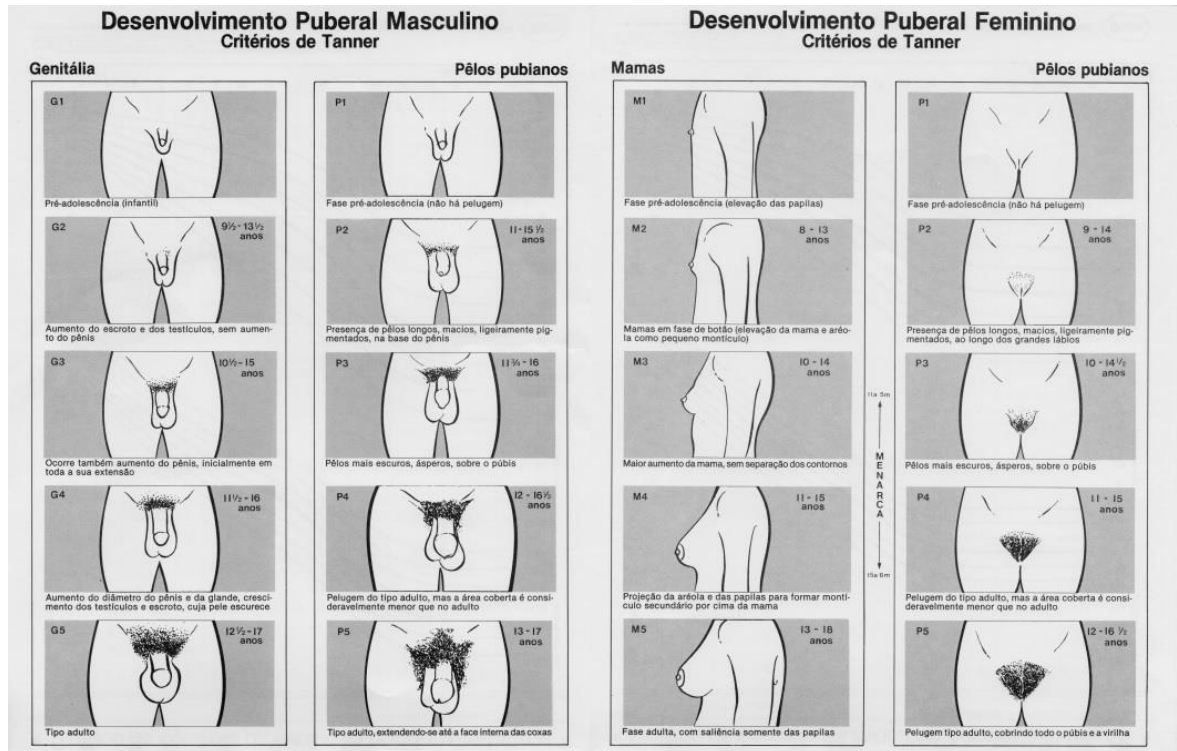


Figura 8: Estadiamento Puberal de Tanner (Disponível em: Sociedade Brasileira de Pediatria - https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2016/10/EstgioPuberal.Tanner-Meninos.pdf e https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2016/10/EstgioPuberal.Tanner-Meninas.pdf)

- Diagnóstico: classificação do distúrbio, diagnóstico etiológico, diagnóstico sindrômico, diagnóstico nosológico, situação do diagnóstico nosológico, evidências para o diagnóstico. Esse protocolo foi aplicado pela mestrandia em 16 casos atendidos no ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL e na Casa do Pezinho, e pelos médicos geneticistas do referido ambulatório, em 29 casos.

Para a coleta de dados do PNTN de Alagoas, foram realizadas reuniões com o coordenador da Casa do Pezinho para o conhecimento da dinâmica dos atendimentos, estrutura física do local, possibilidade de atendimento e realização de coletas de amostras biológicas dos participantes, além de 3 reuniões de alinhamento com a direção médica da MESM, sendo duas remotas e uma presencial. Após 6 meses de negociações, firmada a parceria, a lista dos pacientes com HAC-21OHD em seguimento foi fornecida, junto com alguns telefones para viabilizar o primeiro contato.

A pedido da direção médica da MESM, os atendimentos e seguimento dos pacientes deveriam acontecer na própria Casa do Pezinho. No entanto, por falta de sala para atendimento e de profissionais para coleta de sangue para estudo molecular, a direção médica permitiu que estes pacientes fossem convidados para coleta de dados no HUPAA. Foram contatados 17

pacientes, 7 dos quais compareceram, dois recusaram participação na pesquisa e 8 não compareceram com justificativas relacionadas à falta ao trabalho ou dificuldade de transporte de suas cidades de residência para a capital.

4.3. Ensaio laboratoriais

4.3.1. *Investigação do sexo citogenético*

Para os 32 casos com ambiguidade genital foi solicitado cariótipo de sangue periférico, contudo um paciente foi a óbito antes da coleta de sangue. Para tanto, foram colhidos 5 mL de sangue periférico em heparina dos demais 31 participantes. Após cultivo celular por 72 horas, foi utilizada a técnica de coloração dos cromossomos por Giemsa - bandamento G - conforme protocolo de SCHRECK; DISTÈCHE, 2001, modificado. Seis participantes sem ambiguidade genital também coletaram cariótipo.

Foram analisadas, no mínimo, 40 metáfases de cada participante para definição da presença de cromossomos sexuais XX ou XY. Todos os laudos foram emitidos por único analisador, biomédico especialista em citogenética humana. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (LCH/UNCISAL), instituição parceira desde 2008.

4.3.2. *Rastreamento de alterações patogênicas no gene CYP21A2*

Para a análise do gene *CYP21A2*, foram colhidos 10 mL de sangue total periférico em EDTA dos participantes da pesquisa e de seus genitores, quando possível, para obtenção de DNA genômico. O método de extração de DNA utilizado foi o de lise com Proteinase K seguida de purificação fenólica (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e posterior amplificação por reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) ou digestão por enzima de restrição.

Foram rastreadas 8 alterações provenientes do pseudogene *CYP21A1P*, reconhecidas como as mais prevalentes: p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, p.Gly110Valfs*21, p.Ile172Asn, Cluster6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Gln318* e p.Arg356Trp. Esta etapa vem sendo realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do SGC/HUPAA/UFAL desde 2018, pelo técnico responsável, alunos de iniciação científica e de trabalhos de conclusão de curso, estágio supervisionado e bolsista técnico, sob supervisão dos respectivos orientadores.

Para 5 famílias em que não foram identificadas as variantes que justificassem o fenótipo através das técnicas empregadas no LGMH/SGC/HUPAA/UFAL, foi possível realizar o

sequenciamento do gene *CYP21A2*, além da técnica de MLPA na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) também instituição parceira desde 2008. Para tanto, foi enviada amostra biológica para o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), para a realização destas técnicas. Esta etapa contou com a participação de alunos de pós-graduação sob supervisão da professora orientadora.

4.4. Tabulação e análise dos dados

Todas as informações obtidas foram codificadas para garantir o anonimato dos participantes. Para compor o banco de dados único, as informações foram inseridas em planilha do Microsoft Excel, especificamente criada para este fim.

Foram selecionadas as seguintes variáveis:

- Aspectos sociodemográficos: idade na primeira consulta, município de procedência;
- Características clínicas: anatomia genital externa (masculina, feminina ou ambígua) e grau de virilização genital (conforme as classificações de Prader); fenótipo verificado - Virilizante Simples (VS) Perdedor de Sal (PS) e Não Clássico (NC) -, óbito por crise adrenal (sim ou não);
- Características genéticas: consanguinidade parental, recorrência, genótipos e origem parental das variantes, prevalência da variante (comum, incomum, nova), fenótipo esperado (VS, PS e NC), correlação genótipo-fenótipo (concordante; discordante).

Foi realizada a análise descritiva da amostra, com distribuição de frequência e medidas de tendência central e dispersão com o auxílio dos programas Microsoft Excel e Epi-Info™

5 PRODUTOS

5.1. Produtos finalizados

5.1.1. Clinical and molecular epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in two reference Brazilian services. Artigo original elaborado segundo as normas da revista Jornal de Pediatria (FI: 2,99, Qualis CAPES: A3 – Anexo B)

5.1.2. Banco de dados unificado dos casos de HAC dos dois serviços de referência no SUS em Alagoas

5.2. Produtos propostos

5.2.1. Artigo em andamento sobre a variante nova - Severe Congenital Adrenal Hyperplasia in several members of a consanguineous family: a novel CYP21A2 pathogenic variant

5.2.2 Artigo sobre a variante rara e o possível efeito fundador - High prevalence of an uncommon CYP21A2 pathogenic variant in Alagoas

5.1 Produtos Finalizados

5.1.1. Clinical and molecular epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in two reference Brazilian services

Abstract

Objective: To set a baseline epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (CAH-21OHD) in two Brazilian Health Services located in Alagoas.

Methods: Ambispective, descriptive cross-sectional study, with a convenience sample, with CAH-21OHD patients. Cases with positive neonatal screening or clinical diagnosis based on levels of 17-hydroxyprogesterone were included. Data were collected from medical files and molecular reports of *CYP21A2* gene analysis and inserted in a unique database using Microsoft Excel for descriptive statistics. Ethical approves (CAAE 40078620.4.0000.5013; 18/03/2021).

Results: The database consisted of 45 participants, 38 seen at SGC-HUPAA from 2008 to 2022 and 7 at Casa do Pezinho from 2016 to 2021. The majority were from the Alagoas countryside, 19.5% reported consanguinity and 24.4% familial recurrence. The age at the 1st consultation ranged from 4 days to 34 years old, 72.7% presented with genital ambiguity and 51.7% with Salt-Wasting classic form (SW-CL). The c.290-13A/C>G variant was present in 24.62%, followed by the uncommon p.Ser170Lisfs*125. A novel-variant p.Ser301Pro was identified.

Conclusions: Overall data presented corroborate the literature. The SW-CL form was the most frequent, with a higher prevalence of c.290-13A/C>G variant. The high frequency of the p.Ser170Lisfs*125 variant provide evidence of a possible founder effect. The need for decentralization of services to the countryside is evident. Deaths from adrenal crisis have substantially reduced, but there is still a need to improve the flow of service. The recognition of these characteristics is important at the individual and collective levels, to support and strengthen the health policies for these persons.

Keywords: congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase, neonatal screening, founder effect

Introduction

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive inborn error of adrenal steroid metabolism caused by 21-hydroxylase (21OH) deficiency in more than 95% of the cases¹. The 21-OH deficiency leads to decreasing cortisol and increasing sex steroid

production, the severity of which depends on the residual enzymatic activity. Exposure to high levels of adrenal androgens causes virilization of the fetal female genitalia².

CAH, an example of a Disorder of Sexual Development (DSD)³, is the predominant cause of genital ambiguity. It has been grouped into three clinical phenotypes: nonclassic/late-onset (NC), classic (CL)/early-onset salt wasting (SW), and CL/early-onset simple virilizing (SV)⁴. The global incidence of classic phenotype is 1:10,000-20,000 live births, 75% of which is SW. The prevalence of nonclassic phenotype is 1:200-1,000 cases^{1,5}.

According to the World Health Organization and the Brazilian Policy of Comprehensive Care for People with Rare Diseases, the CAH classic phenotype is an example of rare disease^{6,7}. Despite that, it is the most important cause of neonatal death due to avoidable endocrine disturbs^{1,8}. Therefore, CAH has been part of the Brazilian newborn screening program (Programa Nacional de Triagem Neonatal - PNTN) since 2012⁹.

Although the PNTN is a nation-wide public policy, it is not equally implemented in the country. In Alagoas it actually started in April 2016, although it had been officially announced in 2014. Since then, screened children are followed by a multidisciplinary team at the reference service of neonatal screening (Serviço de Referência em Triagem Neonatal – SRTN), linked to the Maternity Hospital of the Health Sciences State University of Alagoas (SRTN/MESM/UNCISAL)^{9,10}.

Since the implementation of the Brazilian Unified Health System (SUS) in the 1990s up to 2007, the care of patients diagnosed with CAH has not been systematic in Alagoas. In 2008, a coordinated and multidisciplinary approach was pioneered by the Clinical Genetics Service of the University Hospital of the Federal University of Alagoas (SGC/HUPAA/UFAL). This initiative interlinks health care and research, and has become the most detailed source of systematized information on CAH in Alagoas¹¹.

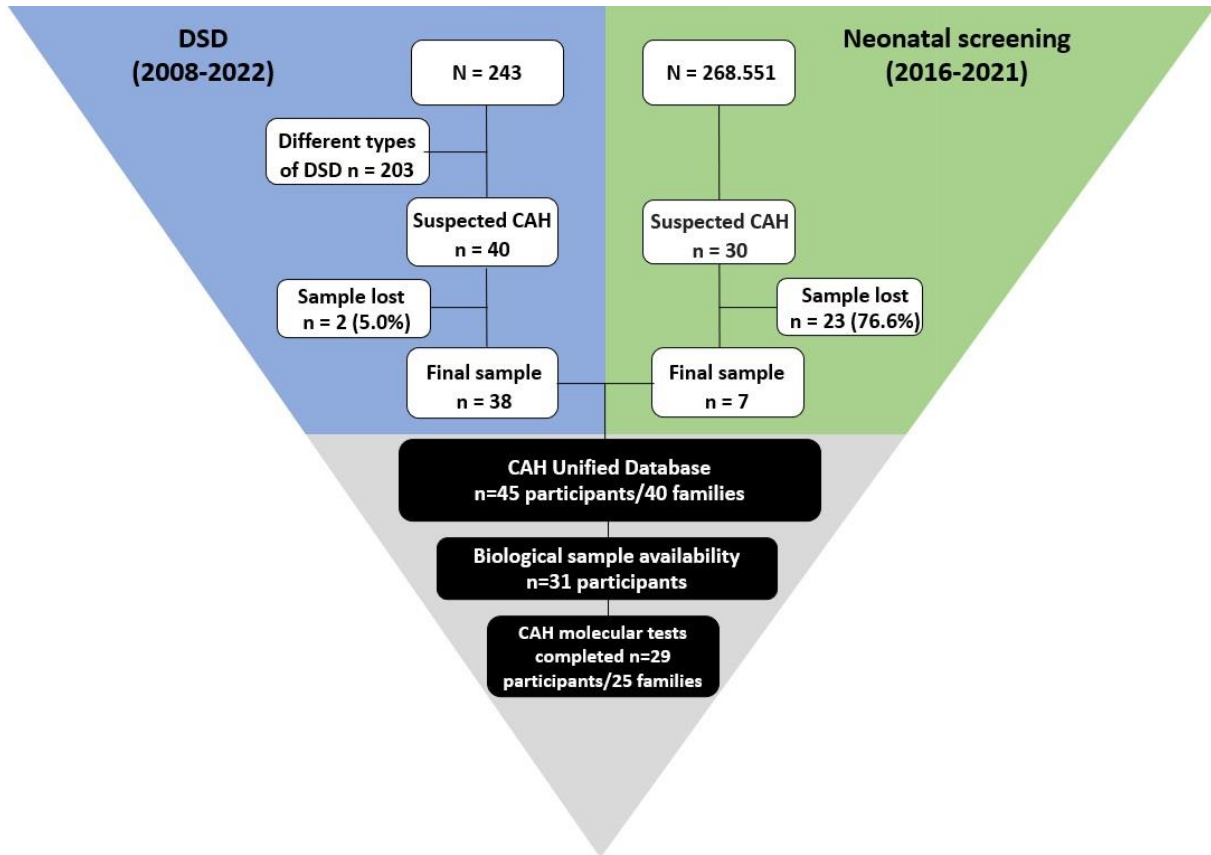
Although the SGC/HUPAA/UFAL and SRTN/MESM/UNCISAL are part of the SUS they have worked independently with no coordinated actions at the clinical and research settings. Addressing this problem was one of the priorities of 2021-2023 Research Program for SUS (Programa Pesquisa para o SUS - PPSUS/Alagoas)¹² this study aimed to gather the information from SGC/HUPAA/UFAL and SRTN/MESM/UNCISAL in a unified database and to provide a baseline descriptive epidemiology on CAH in Alagoas.

Methods

This is a descriptive cross-sectional study, with a sample of 45 patients diagnosed with CAH based on the abnormal levels of 17-hydroxyprogesterone (17OHP). Patients were

followed at the SGC/HUPAA/UFAL from May 2008 to February 2022 and at the SRTN of Alagoas from January 2016 to December 2021. (Figure 1). Cases with inconsistent clinical information were excluded.

Figure 1: Composition of the unified CAH database of patients from the two reference services of Alagoas



A three-generation pedigree, sociodemographic and clinical characteristics were collected through a specific protocol developed in 2008 and used since then.¹³ Therefore, demographic and clinical data are uniformly recorded as a routine from the first visit at the SGC/HUPAA/UFAL. On the other hand, participants from SRTN/MESM/UNCISAL had their data recorded in a single medical visit at the SGC/HUPAA/UFAL, occurred *a posteriori* of the first visit at SRTN. Additionally, data revision was not achievable once the maternity hospital archive linked to SRTN was not accessible.

Variables selected for data tabulation were: age at the first appointment, health service (SGC/HUPAA/UFAL or SRTN), residency (Capital city or other municipality), genital ambiguity (Yes or No. If Yes, Prader classification.), death due to adrenal crisis (Yes or No), given name at the first appointment, gender reassignment (Yes or No), civil registry change (Yes or No), parental consanguinity (Yes or No) and recurrence (Yes or No).

Peripheral blood karyotype was performed in all cases with genital ambiguity and six patients with male genitalia. *CYP21A2* gene analysis was performed according to biological

samples availability. Segregation analyses were performed in all subjects through parental testing. The molecular *CYP21A2* gene analysis was conducted as a two-step strategy: 1) screening of epidemiologically relevant variants through PCR-AS and 2) Sanger Sequencing for cases with no alterations detected through PCR-AS. Electropherograms were analyzed against the reference sequence NM_000500.6. The CTG repeat at the beginning of the gene was removed to follow the numbering system of variants as previously stated in the literature (e.g. p.Pro30Leu and not p.Pro31Leu). MLPA (MRC-Holland P050 MLPA kit, Amsterdam, Netherlands) was used to define gene copy numbers. Case-by-case anonymous information was entered into a Microsoft Excel database. The Epi-Info™ version 7.1 software was used for descriptive statistics.

The study was approved by the Ethics Committee of the local Institutional Review Boards of UFAL (CAAE 40078620.4.0000.5013; 18/03/2021).

Results

During the studied period, a total of 70 patients had diagnosis suspicion of CAH in both services. Twenty-five (35.7%) of them were lost, 23 of which at the SRTN/MESM/UNCISAL. Therefore, 45 (64.3%) participants entered the unified database, corresponding to 40 families. Thirty-eight (84.4%) of them were followed at the SGC/HUPAA/UFAL, while 7 (15.6%) at the SRTN/MESM/UNCISAL (Figure 1).

Nine out of 10 sanitary macro-regions of Alagoas are represented in the unified database. The majority of the participants (n=23 | 52.2%) were living in the metropolitan region that comprises 13 municipalities (Atalaia, Barra de Santo Antônio, Barra de São Miguel, Coqueiro Seco, Maceió, Marechal Deodoro, Messias, Murici, Paripueira, Pilar, Rio Largo, Santa Luzia do Norte e Satuba)¹⁴.

Twenty-two participants were living in the 1st sanitary macro-region, 11 (50,0%) of which were living in the capital (Maceió). One participant were living in the 2nd, three in the 3rd and one in the 4th sanitary macro-region. The remaining participants spread through the center and West side of Alagoas (Figure 2a).

Table 1 summarizes sociodemographic and clinical data. Age of entrance in the database ranged from 4 days to 34 years old (30-days old at 25th, 1-year-old at 50th, and five years old at 75th percentile). Among participants from the SGC/HUPAA/UFAL there were 11 newborn infants (4 to 27-days-old); 10 young infants (30-days to 8-months-old); 10 infants (one to 9-years-old); five adolescents (10 to 15-years-old), and two adults (25 and 34-years old).

Participants from the SRTN/MESM/UNCISAL were comprised of three young infants (two, 8 and 9 months-old) and three infants (one, four and four-years-old).

Table 1: Descriptive analysis of social, demographic and clinical characteristics of the sample

Characteristics	N	%
Origin service (N=45)		
HUPAA	38	84.4
SRTN	7	15.6
Local of residence (N=44)¹		
Capital	11	25.0
Non-capital	33	75.0
Age-group at entrance into the database (n=44)¹		
Newborn	11	25.0
Young infants	13	29.5
Infants	13	29.5
Adolescents	5	11.4
Adults	2	4.6
Genital ambiguity (n=44)¹		
Yes	32	72.7
No	12	27.3
Prader classification (n=32)²		
PI	4	12.5
PII	1	3.1
PIII	15	46.9
PIV	9	28.1
PV	3	9.4
Lethal adrenal crisis (N=45)		
Yes	4	8.9
No	41	91.1
Given name at first appointment (N=44)¹		
Male	24	54.5
Female	20	45.5
Gender reassignment (N=43)^{1,3}		
Yes, to female	4	9.3
No	39	90.7
Civil identity reassignment (N=43)^{1,3}		
Yes, to female	2	4.7
No	31	72.1
Not applicable	10	23.2
Parental consanguinity (N=41)⁴		
Yes	8	19.5
No	31	75.6
No information	2	4.9
Familial recurrence (N=41)⁴		
Yes	10	24.4
No	27	65.9
No information	1	2.4
Doubtful	3	7.3

¹Missing data of a child who deceased before first appointment.

²Total number of genital ambiguity.

³Missing data of a child whose family ceased follow-up.

⁴Three index participants had siblings in the sample, while the other two were adopted twins.

Genital ambiguity was present in 32 (72.7%) participants most of whom classified as Prader III. Prader classification was not possible for a child who deceased before first appointment, therefore clinical information was provided by the parents. During the study interval (2008-2022), four (8.9%) participants deceased due to adrenal crisis, two were born before and two after the implementation of neonatal screening. The ratio of male to female given names was 1.2:1. During follow-up, four children had gender reassignment from male to

female, while two of these also changed their civil registrations. Among the 41 families, 19.5% reported parental consanguinity and 24.4% had familial recurrence (Table 1).

Karyotype was performed for 37 (82.2%) participants, 31 of whom were 46,XX. Thirty-one families provided biological material for *CYP21A2* gene analysis. For 25 of families, corresponding to 29 index cases, the molecular diagnosis was elucidated. As a child deceased before the laboratory confirmation, only the biological sample of the parents (F5) was available. Because the child F26p1 is adopted, all but one family had their segregation analysis concluded. Although families F11 and F35 are related, they were considered distinct for the segregation study (Table 2).

Table 2: Genetic and molecular characterization of the families studied

Family	Consanguinity	Recurrence	Patient	Neonatal screening	Variants (maternal/paternal)	Index phenotype	Expected phenotype
1	Y	Y	F1p1	N	c.290-13A/C>G / p.Gln318*+p.Arg356Trp	SV	SW
			F1p2	N	c.290-13A/C>G / p.Gln318*+p.Arg356Trp	SV	SW
2	Y	Y	F2p1	N	p.Ser170Lysfs*125 / p.Ser170Lysfs*125	SW	SW
3	N	Y	F3p1	N	del30kb CYP21A1P/CYP21A2 ¹ / p.Ile172Asn	SV	SV
			F3p2	N	del30kb CYP21A1P/CYP21A2 ¹ / p.Ile172Asn	SV	SV
4	N	Y	F4p1	N	c.290-13A/C>G / c.290-13A/C>G	SV	SW
			F4p2	N	c.290-13A/C>G / c.290-13A/C>G	SV	SW
5	N	N	F5p1	N	p.Ser170Lysfs*125/ conv. CYP21A1P/CYP21A2 with Ex6M ¹ †	SW	SW
6	N	N	F6p1	N	p.Gln318*+p.Arg356Trp / p.Arg408Cys ²	SV	SW
8	N	N	F8p1	N	conv. CYP21A1P/CYP21A2 with Ex6M ¹ / c.290-13A/C>G	SV	SW
9	N	N	F9p1	N	p.Gln318+p.Arg356Trp / p.Arg356Trp	SW	SW
11	Y	Y	F11p1	N	p.Ser301Pro / p.Ser301Pro ³	SW	SW
			F11p2	Y	p.Ser301Pro / p.Ser301Pro	SW	SW
12	Y	N	F12p1	Y	c.290-13A/C>G / c.290-13A/C>G	SV	SW
14	Y	N	F14p1	N	p.Ser170Lysfs*125 / p.Ser170Lysfs*125	SW	SW
15	Y	N	F15p1	N	p.Val281Leu / p.Arg356Trp	NC	NC
16	Y	Y	F16p1	N	p.Ser170Lysfs*125 / p.Ser170Lysfs*125	SW	SW
17	N	N	F17p1	N	p.Ile172Asn / p.Ile172Asn	SV	SV
21	N	N	F21p1	N	c.290-13A/C>G / c.290-13A/C>G	SW	SW
25	Y	N	F25p1	N	p.Ser170Lysfs*125/ p.Ser170Lysfs*125	SW	SW
26	NI	NI	F26p1	N	c.290-13A/C>G / p.Val281Leu ⁴	NC	NC
28	N	N	F28p1	Y	c.290-13A/C>G / c.290-13A/C>G	SW	SW
30	N	N	F30p1	N	p.Val281Leu / c.290-13A/C>G	NC	NC

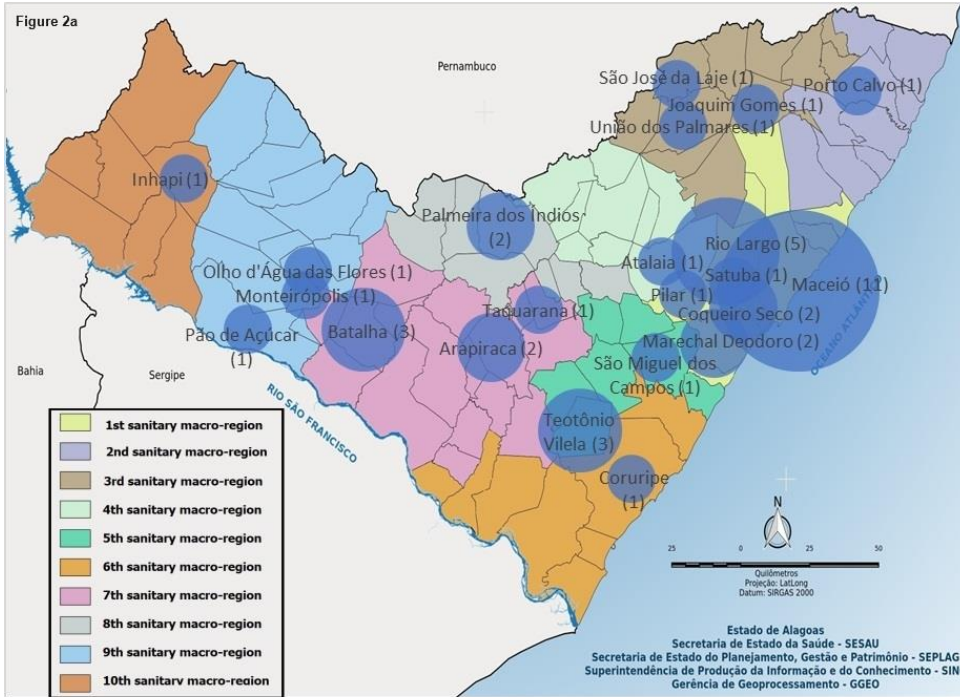
31	N	N	F31p1	Y	p.Arg356Trp / p.Ile172Asn	SW	SV
35	N	Y	F35p1	Y	c.290-13A/C>G + p.Gly110Valfs*21 / p.Ser301Pro	SW	SW
36	N	N	F36p1	Y	p.Val281Leu / p.Ile172Asn	SW	NC
37	N	N	F37p1	Y	p.Ser170Lysfs*125 / p.Val281Leu+p.Gln318*	SW	SW
39	N	N	F39p1	N	p.Ser170Lysfs*125 / p.Gln318*+p.Arg356Trp	SW	SW
40	N	N	F40p1	Y	p.Ile172Asn / p.Arg356Trp	SV	SW

N: No; Y: Yes; NI: No information; SW: Salt Wasting; SV: Simple virilizing; NC: Non classical; † Genotype deduced from the parental segregation study, as the patient deceased before the collection of the biological material; 1 result obtained by the MLPA technique at Center for Molecular Biology and Genetic Engineering of Campinas State University (CBMEG/UNICAMP); 2 result obtained by the sequencing technique at CBMEG/UNICAMP; 3 result initially obtained by the sequencing technique at CBMEG/UNICAMP and confirmed by PCR-AS at Human Molecular Genetics Laboratory (Laboratório de Genética Molecular Humana – LGMH)/SGC/HUPAA/UFAL; 4- the segregation analysis was not possible once the child was adopted.

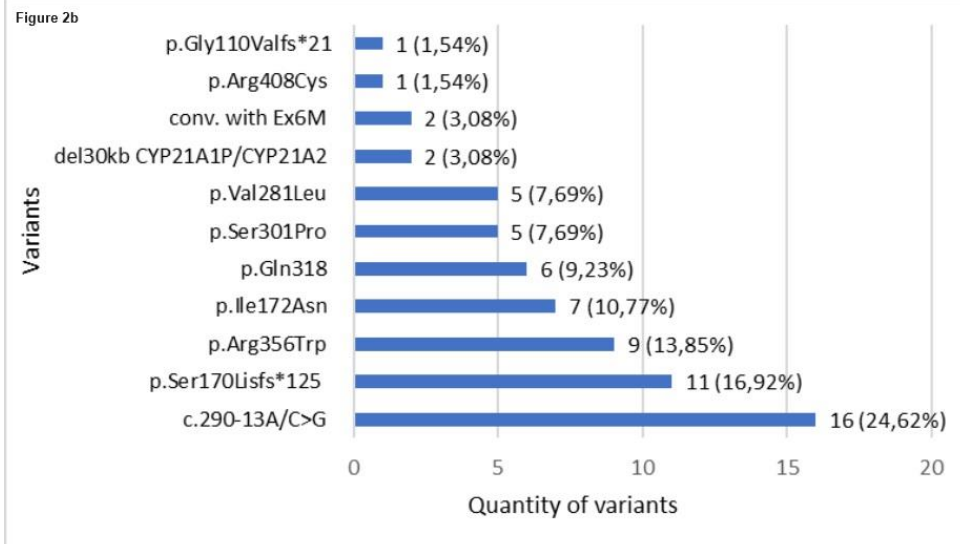
The SW phenotype was the most frequent in clinical (51.7%) and genotype (72.4%) analyses. The genotype-phenotype correlation was concordant for 65.5% of the participants.

Eleven distinct pathogenic variants were identified. The c.290-13A/C>G variant was identified in 16 (24.62%) alleles, followed by the uncommon p.Ser170Lysfs*125 variant in 11 (16.92%), four of which were consanguineous with homozygous phenotype. The geographic distribution of the p.Ser170Lysfs*125 variant is shown in Figure 2c. The novel variant p.Ser301Pro was found in the two related families (F11 and F35) (Table 2, Figure 2b).

Figure 2a: Distribution of patients diagnosed with CAH through the sanitary macro-region of Alagoas. **Figure 2b:** Distribution of pathogenic *CYP21A2* variants among 58 alleles. **Figure 2c:** Geografic distribution of p.Ser170Lysfs*125 alleles in Alagoas.



Fonte: IBGE 2018, Malha Municipal; SESAU 2011, Regiões de Saúde de Alagoas; SEPLAG/SINC/GGEO 2020.



Discussion

Reference services for CAH in Alagoas

Alagoas is the second smallest Brazilian state unit, with a territorial extension equivalent to Haiti and an estimated population of 3,365,351¹⁵. According to the last Brazilian National Health Survey, carried out in 2019¹⁶, the SUS serves 87.2% of the population of Alagoas and during the study period, according to the Information Technology Department of the Brazilian Unified Health System (DATASUS) and SRTN, 90.1% of live births underwent neonatal screening through SUS (see supplementary material for the incidence of CAH in Alagoas 2016-2021)¹⁷. This figure depicts the importance of having organized public services attending to specific health demands. In the case of caring for people living with CAH, the SGC/HUPAA/UFAL and the SRTN/MESM/UNCISAL, play a central role. Both are university hospital-based and multidisciplinary services located in the capital of Alagoas.

The SGC/HUPAA/UFAL is an open-door genetic unit that provides assessment and counseling for any person having a birth defect or late-onset genetic disease. Since 2008, it has been the core of a multidisciplinary follow-up and research for persons with DSD, CAH included. The current team composition includes geneticists, psychologists, nurses, radiologists, bioethicists, pediatricians, and pediatric endocrinologists and surgeons. Also, genetic testing for CAH has been performed as research protocol ever since^{11,18,19}.

The team's workflow starts with the first visit independently if at the genetic, pediatric, endocrinologic or surgical clinic. During genetic consultation, families that give informed consent have their socio-demographic and clinical information systematically collected. Biological samples are routinely obtained for karyotyping and molecular testing. Meanwhile, the patient's follow-up continues with the members of the team. Once a month, the professionals meet to discuss and agree on the treatment¹⁹.

The SRTN/MESM/UNCISAL is a branch of the PNTN, a nationwide health policy, that provides clinical follow-up and genetic counseling for patients screened for phenylketonuria, congenital hypothyroidism, hemoglobinopathies, cystic fibrosis and, since 2016, biotinidase deficiency and CAH. There is a multidisciplinary team of geneticists, psychologists, pediatric endocrinologists, pediatric hematologists, nutritionists, social workers and nurses. The team works only in the healthcare area, however, they do not meet to discuss and agree on the treatment plan for individual cases.

The geneticist, psychologist, and pediatric endocrinologist assess the patient at the first appointment. Afterward, it is established a quarterly follow-up with the pediatric

endocrinologist and, if it is needed, a nutritionist. During visits, each specialist freely enters socio-demographic and clinical information into a paper-based record. Karyotyping and genetic testing are not routine procedures.

As seen in Figure 1, SGC/HUPAA/UFAL amounted to over 80% of the final sample due to the massive loss of potential participants from the SRTN/MESM/UNCISAL. It is worth mentioning that parents of 13 children had no operative mobile phone and 8, who could be contacted, did not attend the scheduled appointments due to the costs of displacement. Obviously, this situation is related to the increasing poverty in Brazil ²⁰. As such, it should be a matter of management concerns aiming to the integral care for persons with CAH through SUS. Anywise, the underrepresentation of the SRTN/MESM/UNCISAL is a limiting factor and may have biased the results.

Descriptive epidemiology of CAH based on the unified database of Alagoas

Geographic distribution of participants' domicile showed that almost all sanitary macro-regions of Alagoas. However, a gradient with a higher number of cases in the municipalities closest to Maceió drew our attention. This feature suggests that persons living up 100km far from Maceió experience less difficulties in maintain a regular multidisciplinary follow-up. Similar results are provided by other studies with other chronic conditions, congenital anomalies and rare diseases ^{21,22,23}.

However, problems are not limited to the follow-up. Non-coordination between the localities responsible for the blood sampling and delivery, and the screening laboratory, also located in Maceió, and vice-versa, is another important issue. This serious problem was illustrated in the present study by a 2-months old child, screened at the neonatal period in 2021, who deceased without receiving the result of laboratory tests.

Since 2008, demographic and clinical data has been systematical and continuously recorded at the SGC/HUPAA/UFAL through a specific protocol¹³ used from the first medical visit when we additionally obtain the informed consent. Initially paper-based, nowadays there is a digital version of this protocol. Information is stored into both digital and physic archives.

Medical-record at SRTN/MESM/UNCISAL is freehand. Information is stored in a paper-based archive which was not accessible during our data collection. Patients and parents were invited to participate in the study and had their data recorded through our protocol in a single medical visit which do not correspond to their first visit at SRTN/MESM/UNCISAL. As a consequence, their age of entrance into the database does not overlap their age when the multidisciplinary follow-up started.

The wide range of ages observed in the sample reflects specific characteristics of the SGC/HUPAA/UFAL such as the systematic care for patients with CAH at HUPAA began in 2008, 8 years before the inclusion of this disease in the PNTN; the open-door schedule system; the absence of age limit; and the inclusion of adults seeking genetic counseling, to cite some.

These reasons also justify the predominance of genital ambiguity since the expected rate would be 1:1. Despite this, civil and gender reassignment from male to female was low. With the inclusion of CAH in the PNTN in 2016, male patients are experiencing an earlier diagnosis and treatment.

Genetic profile and baseline molecular epidemiology

The molecular profile corroborates the literature since most patients are compound heterozygotes, while the homozygotes prevail among consanguineous parents²⁴. The rate of consanguineous marriages in Brazil is relatively low, around 1.87%. However, as it is a continental country, the regional differences are huge. In the northeast region, where Alagoas state is located, this rate rises to around 10%, reaching over 40%²⁵. In the present sample, 19.5% of parental couples were consanguineous, showing that it is still a common practice, especially in remote villages of Sertão.

As expected from the literature, the c.290-13A/C>G variant was the most prevalent. This splice variant confers an important 21OH loss of function, determining the SW phenotype²⁶.

It is noteworthy that the high frequency of the uncommon p.Ser170Lisfs*125 variant was verified in almost 17.0% of the alleles, achieving the second position in the sample. The variant is not derived from the pseudogene and results in a truncated protein that affects the enzymatic availability leading to a significant loss of function and a SW phenotype. It was first identified in four Brazilian families in 2002²⁷ with no additional reports ever since. The high frequency of this variant in unrelated families residing in distant sites suggests a common mutagenic origin related to a founder effect²⁸. The third and fourth most frequent variants, p.Arg356Trp (13.85%) and p.Ile172Asn (10.77%), are related with both the SW and SV phenotypes.

Together these four variants (c.290-13A/C>G, p.Ser170Lisfs*125, p.Arg356Trp and p.Ile172Asn) responded by 66.16% of the pathogenic alleles. This epidemiological data is crucial to plan strategies for genetic testing through SUS in Alagoas.

It should be highlighted that the Human Molecular Genetics Laboratory (LGMH/HUPAA/UFAL) is the single site with the expertise and infrastructure to perform this

genetic test in Alagoas. Furthermore, the laboratory essays implemented, Allele-specific polymerase chain reaction are cost-effective and may be extended to other 4 variants (p.Gln318*, p.Val281Leu, p.Ser301Pro, p.Gly110Valfs*21) involved in 26.15% of the cases in the current sample.

Besides common and uncommon variants, the novel p.Ser301Pro was found. This variant was first identified in a homozygous child of consanguineous parents. Afterward, it was also identified in her homozygous sister and in her first cousin who is a compound heterozygote (c.290-13A/C>G + p.Gly110Valfs*21 / p.Ser301Pro) whose parents are not consanguineous. In this family, children presented SW phenotype. The pedigree suggests the variant is in the family at least five generations ago. The novel variant p.Ser301Pro impacts the protein conformation leading to the loss of enzymatic function according to predictive analysis (data to be published elsewhere).

The genotype-phenotype correlation was concordant in about 65.5% of the cases. The concordance rate is quite variable in the literature^{29,30}. In our sample, it may be due to the high frequency of the c.290-13A/C>G variant for which the clinical picture ranges from SV phenotype to NC phenotype. The underpinning hypothesis is that the c.290-13A/C>G variant generates alternative transcripts that avoid aberrant splicing. This mechanism would allow the production of small quantities of a normal enzyme that would make the phenotypes milder²⁶.

As final considerations, this study provided the first overview of sociodemographic, clinical and genetic characteristics of persons with CAH assisted through SUS in Alagoas. Although the SRTN was underrepresented in the sample, the data gathered demonstrate the importance of a unified database to improve knowledge on specific health conditions in specific settings. As part of a national policy, the SRTN urgently should overcome management and structural shortfalls disclosed in the present study.

The geographic distribution of CAH in Alagoas corroborates the need for decentralization of reference services to answer unmet health needs for patients living far from the capital. The baseline molecular epidemiology revealed the most prevalent pathogenic variants in our population, all of them have been identified in the LGMH/SGC/HUPAA/UFAL in a cost-effective manner.

Acknowledgment: Participants of this study, SGC/HUPAA/UFAL multidisciplinary team, SRTN multidisciplinary team, Center for Molecular Biology and Genetic Engineering of Campinas State University (CBMEG/UNICAMP), LGMH/SGC/HUPAA/UFAL and Human Cytogenetics Laboratory of Health Sciences of Alagoas State University (LCH/UNCISAL).

Support: PPSUS-FAPEAL: 60030.000898/2016; 60030.0000000212/2021

References

- [1] Merke DP, Auchus RJ. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *N Engl J Med* 383;13, September 24, 2020.
- [2] Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005; 365: 2125–36
- [3] Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 22, No. 1, pp. 119–134, 2008
- [4] Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke DP. Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Apr; 23(2): 181–192.
- [5] El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 2017; 390: 2194–2210
- [6] Giugliani L, Vanzella C, Zambrano MB, Donis KC, Wallau TKW, Costa FM, Giugliani R. Clinical research challenges in rare genetic diseases in Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 42 (1 suppl 1), 2019
- [7] Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014. Available: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html. Access: 20/10/2022
- [8] Lemos-Marini SHV, Mello MP. Hiperplasia adrenal congênita. *In: Maciel-Guerra AT, Guerra Júnior G. Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação de sexo. Vol 1. 3rd ed. Curitiba: Appris, 2019. p 193-222*
- [9] Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012. Available: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt2829_14_12_2012.html. Access: 20/10/2022
- [10] Alagoas. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 280, de 4 de abril de 2014. Available: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/sas/Links%20finalizados%20SAS%202014/prt0280_04_04_2014.html. Access: 20/10/2022
- [11] Zanotti SV, Monlleó IL. Psicanálise e genética: uma experiência de interlocução no SUS. *In: Rudge AM, Besset V. (Org.). Psicanálise e outros saberes. Rio de Janeiro: Cia de Freud, 2012. p. 249-267.*
- [12] Alagoas. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL). Divulgação do resultado final do julgamento. Chamada FAPEAL 06/2020 – PPSUS -

- Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em Saúde - Decit-SCTIE-MS/CNPq/FAPEAL/ SESAU-AL. Available: https://www.fapeal.br/wp-content/uploads/2021/04/DIVULGACAO-DO-RESULTADO-FINAL-PPSUS-2020_23-04-2021.pdf. Access: 03/11/2022
- [13] Gazzaneo IFP et al. Perfil de pacientes com anormalidades geniturinárias atendidos em serviço de genética clínica no Sistema único de saúde. *Revista Paulista de Pediatria*. Volume 34, Issue 1, March 2016, Pages 91-98
- [14] Alagoas. Região Metropolitana de Maceió. Available: <https://regiao metropolitana.al.gov.br/sobre-a-rmm/>. Access: 02/11/2022
- [15] Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Alagoas. Available: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/panorama>. Access: 07/10/2022
- [16] Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério da Saúde. Ministério da Economia. Pesquisa nacional de saúde: 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde : Brasil, grandes regiões e unidades da federação / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Available: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101748.pdf>. Access: 07/10/2022
- [17] Brasil. MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos - SINASC. DATASUS. Available: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Access: 03/10/2023
- [18] Assunção IV, Gomes EAP, Zanotti SV, Rezende FRM, Monlleó IL. Escuta clínica em um ambulatório de genética: uma experiência extensiva. *Est. Inter. Psicol.* [online]. 2020, vol.11, n.3, pp. 218-231. ISSN 2236-6407. <http://dx.doi.org/10.5433/2236-6407.2020v11n3p218>.
- [19] Silva MG, Petrolí RJ, Monlleó IL, Zanotti SV. Reunião clínica de distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo durante a pandemia do covid-19: uma experiência de trabalho remoto multidisciplinar. In: *Os desafios e inovações da extensão universitária na área de saúde em tempo de COVID-19 [recurso eletrônico] / Cristiana Carina de Barros Lima Dantas Bittencourt... [et al.] [organizadores]. – Maceió, AL : EDUFAL, 2022. 463 p. : il. ISBN 978-65-5624-113-5.*
- [20] Bagolin, IP; Salata, A; Mattos, EJ. Pobreza Social no Brasil: 2012-2021. Laboratório de Desigualdades, Pobreza e Mercado de Trabalho – PUCRS Data Social. Porto Alegre, 2022. Available: https://www.pucrs.br/datasocial/wp-content/uploads/sites/300/2023/02/Estudo-Pobreza-Social-19.01_final.pdf. Access: 03/10/2023

- [21] Massenburb BB, Jenny HE, Saluja S, Meara JG, Shrimme MG, Alonso N. Barriers to Cleft Lip and Palate Repair Around the World. *J Craniofac Surg.* 2016 Oct;27(7):1741-1745. doi: 10.1097/SCS.0000000000003038.
- [22] Brundisini F, Giacomini M, DeJean D, Vanstone M, Winsor S, Smith A. Chronic disease patients' experiences with accessing health care in rural and remote areas: a systematic review and qualitative meta-synthesis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2013 Sep 1;13(15):1-33. eCollection 2013.
- [23] Cox E, Awe M, Sabu S, Tumin D, Akpan US. Does greater distance from the hospital exacerbate socioeconomic barriers to neonatal intensive care unit clinic attendance? *J Rural Med.* 2023 Apr; 18(2): 55–61. doi: 10.2185/jrm.2022-035
- [24] Pignatelli D, Carvalho BL, Palmeiro A, Barros A, Guerreiro SG, Macut D. The Complexities in Genotyping of Congenital Adrenal Hyperplasia: 21-Hydroxylase Deficiency. *Front. Endocrinol.*, 04 July 2019
- [25] Kozuki CG, Steiner CE. Consanguinity and Geographic Origin of Patients With Autosomal Recessive Metabolic Disorders Evaluated in a Reference Service in Campinas, Brazil. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*, 2015.
- [26] Kocova M, Concolino P, Falhammar H. Characteristics of In2g variant in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Front. Endocrinol.*, 24 January 2022
- [27] Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJP, Bachega TASS. Three Novel Mutations in CYP21 Gene in Brazilian Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency Due to a Founder Effect. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(9):4314–4317, 2002
- [28] Futuyma DJ. *Biologia evolutiva*. 2nd ed. Ribeirão Preto: SBG, 1992, 631 p
- [29] Narasimhan ML, Khattab A. Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertility and Sterility*, Vol. 111, No. 1, January 2019
- [30] New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dunic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2013; 110: 2611-2616

5.1.2 Banco de dados unificado dos casos de HAC dos dois serviços de referência no SUS em Alagoas

O primeiro produto desta pesquisa foi a construção de um banco de dados unificado dos casos de HAC atendidos no Ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL e na Casa do Pezinho pelo SRTN/MESM/UNCISAL, não somente para a tabulação dos dados necessários a esta pesquisa, mas também como legado para futuros estudos que necessitem de um banco de dados dos dois serviços de referência no atendimento de pacientes com HAC no SUS em Alagoas.

O banco de dados foi construído em planilha excel, por ser de fácil acesso e ter a vantagem de ser lido por vários pacotes estatísticos. Todos os dados, incluindo o nome dos pacientes, receberam códigos numéricos, com as respectivas legendas em planilha a parte, de modo a garantir o anonimato dos sujeitos.

As linhas da planilha correspondem aos pacientes, que recebem número de registro seguindo a ordem de entrada no banco, desde o início da implantação do ambulatório integrado de DDS do SGC/HUPAA/UFAL. O número do registro não é exclusivo dos pacientes com HAC, mas de todos os pacientes com DDS do ambulatório.

As colunas da planilha correspondem aos dados clínicos colhidos a partir do protocolo genético-clínico utilizado nas consultas de primeira vez e retornos. Os dados que compõem a planilha são: Registro, Data de Nascimento, Data da Primeira Consulta, Idade na Primeira Consulta em anos, Meses na Primeira Consulta, Dias na Primeira Consulta, Faixa Etária, Ano do Atendimento, Ambulatório de Origem, Procedência, Alta Isonimia, Naturalidade, Registro Civil na Primeira Consulta, Nomeação na Primeira Consulta, Mudou Registro Civil, Mudou Sexo Social, Consanguinidade Parental, Recorrência Familiar, Manifestações Genitais, Gravidade da Ambiguidade Genital, Gônada Palpável, Ultrassonografia da Genitália Interna, Ultrassonografia do Trato Urinário, Cariótipo, Número de Metáfases, Categoria Clínica, Diagnóstico Síndrômico, Diagnóstico Nosológico, Situação do Diagnóstico Nosológico e Situação do Seguimento.

Este banco deve ser alimentado constantemente, à medida que novos pacientes iniciem o seguimento em um dos serviços. Uma vez que o coordenador da Casa do Pezinho também é membro da equipe multidisciplinar de DDS do HUPAA, sendo o elo entre estes dois serviços, a manutenção desta ferramenta fica garantida, com proposta de alimentação dos novos casos a cada semestre e revisão e atualização dos dados, de acordo com as consultas de retorno dos pacientes, anualmente.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Re	Data de nascimento	Data da consulta	Idade na consulta	Meses na consulta	Dias na consulta	Faixa Etária	Ano do atendimento	Ambulatorio de origem	Procedenci	Alta isonim	Naturalidad	Registro Civil consulta 1	Nomeacao consulta 1	Mudou
2	3	16/05/2004	04/06/2009	5	61	1845	3	2009	1	3	2	3	2	2	3
3	20	22/10/1998	28/10/2010	12	144	4389	3	2010	1	20	2	999	2	2	3
4	25	30/10/2010	16/12/2010	0	2	47	2	2010	1	14	2	1	2	2	3
5	29	24/01/2011	10/02/2011	0	1	17	1	2011	1	15	2	3	3	2	4
6	30	14/02/2011	24/02/2011	0	0	10	1	2011	1	16	2	1	2	2	3
7	37	16/03/2001	18/08/2011	10	125	3807	3	2011	1	1	2	1	2	2	3
8	39	09/08/2011	08/09/2011	0	1	30	1	2011	1	19	1	1	3	1	
9	41	01/04/2011	17/11/2011	0	7	230	3	2011	1	20	2	1	2	2	3
10	42	28/09/2011	23/05/2012	0	8	238	3	2012	1	1	2	1	2	2	3
11	75	25/02/2007	24/01/2012	4	59	1794	3	2012	1	14	2	1	2	2	3
12	79	08/06/2008	13/12/2012	4	54	1649	3	2012	1	1	2	1	2	2	3
13	81	07/02/2013	21/02/2013	0	0	14	1	2013	1	3	2	3	3	2	4
14	118	16/10/2013	29/11/2013	0	1	44	2	2013	1	14	2	1	1	1	3
15	147	14/01/2015	21/01/2015	0	0	7	1	2015	1	27	2	27	3	2	4
16	151	20/06/2012	18/03/2015	2	33	1001	3	2015	1	44	2	999	1	1	3
17	155	18/03/2015	01/06/2015	0	3	75	2	2015	1	29	2	3	3	1	4
18	158	22/02/2015	15/07/2015	0	5	143	3	2015	1	30	2	11	1	1	1
19	161	17/10/2015	13/11/2015	0	1	27	1	2015	1	6	2	12	1	1	1

Figura 10: Imagem de parte do banco de dados unificado dos casos de HAC dos dois serviços de referência no SUS em Alagoas

5.2 Produtos propostos

5.2.1 Artigo em andamento sobre a variante nova - *Severe Congenital Adrenal Hyperplasia in consanguineous family: a novel CYP21A2 pathogenic variant*

Para uma família desta casuística, durante a investigação molecular do gene *CYP21A2*, não foram identificadas nenhuma das 9 variantes rastreadas por PCR-AE e digestão com enzima de restrição no LGMH/HUPAA/UFAL. O sequenciamento completo do gene foi realizado na instituição parceira CBMEG/UNICAMP e foi identificada a alteração p.Ser301Pro, nunca descrita previamente na literatura, em homozigose no caso índice (Figura 5: IV-6). A segregação da alteração foi confirmada nos genitores, um casal de primos em 2º grau, sendo o pai da segunda geração e a mãe da terceira geração. Por se tratar de uma alteração nova, foram realizados estudos de conservação de aminoácido utilizando o programa *Clustal Omega*, de predição da sua patogenicidade utilizando os softwares *PolyPhen-2*, *Align GVGD*, *SNPs&GO* e análise *in silico* da estrutura da proteína no programa *PyMol Viewer*. Os programas de predição foram unânimes quanto à patogenicidade da alteração. Posteriormente, uma criança do casal (Figura 5: IV-9), de sexo social masculino, triada pelo PNTN para HAC-21OHD, cariótipo 46,XX, registrada posteriormente no sexo feminino. A investigação molecular por PCR-AE realizado no LGMH/HUPAA/UFAL confirmou se tratar da homozigose da alteração p.Ser301Pro. Durante o estudo, tomou-se conhecimento de um primo do probando (Figura 5: IV-10), também diagnosticado com HAC-21OHD. A investigação molecular do gene *CYP21A2* no LGMH/HUPAA/UFAL revelou o genótipo c.290-13A/C>G+p.Gly110Valfs*21/p.Ser301Pro de herança materna e paterna respectivamente. O heredograma da família está representado na figura 5.

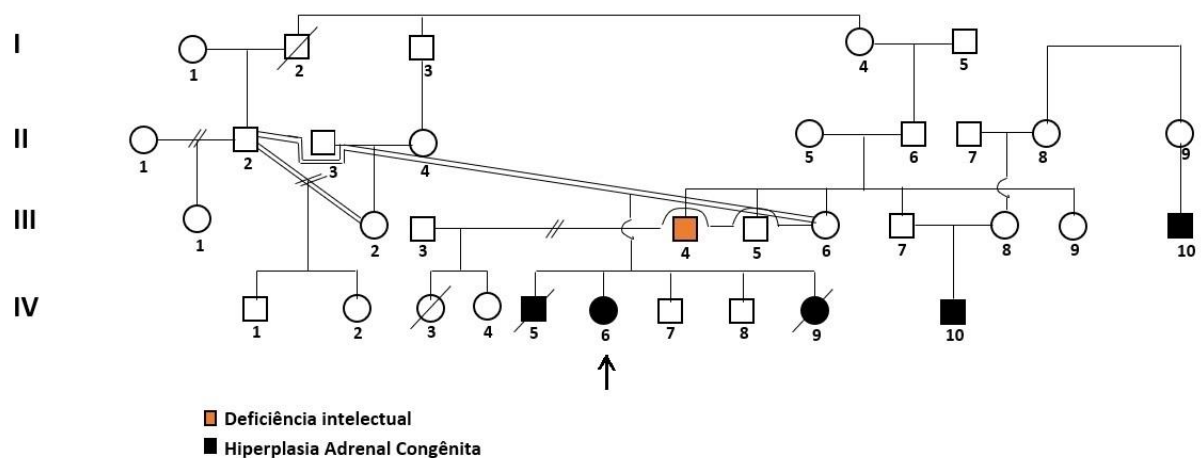


Figura 9: Heredograma de 4 gerações da família portadora da variante nova p.Ser301Pro no gene *CYP21A2*.

Com base nos dados apresentados, surgiu a proposta de elaborar um artigo que descreva a alteração nova p.Ser301Pro bem como a predição do seu efeito na função enzimática, que está em andamento.

Neste sentido, o título provisório para esse artigo é: Severe Congenital Adrenal Hyperplasia in several members of a consanguineous family: a novel *CYP21A2* pathogenic variant

5.2.2 Artigo sobre a variante rara e o possível efeito fundador - *High prevalence of an uncommon pathogenic variant of CYP21A2 in Alagoas*

Durante o rastreamento por PCR-AE das 8 alterações derivadas do pseudogene no LGMH/HUPAA/UFAL alguns casos não foram esclarecidos. A investigação por sequenciamento completo do gene *CYP21A2* pela técnica de Sanger e, quando necessário por MLPA, na instituição parceira CBMEG/UNICAMP esclareceu o diagnóstico molecular de 8 famílias (9 indivíduos). Destas, 4 famílias (4 indivíduos) possuem a alteração rara não derivada do pseudogene p.Ser170Lysfs*125 sendo três pacientes homozigotos e um heterozigoto composto.

Essa alteração foi descrita pela primeira vez em heterozigose em 4 famílias com indivíduos afetados por HAC-21OHD (BILLERBECK, A.E. et al., 2002) onde o estudo por microssatélite mostrou o mesmo haplótipo nos afetados e seus familiares, sugerindo um possível efeito fundador na população brasileira. Em uma busca nos bancos de dados *ClinVar* e *HGMD* (Human Gene Mutation Database) e também na plataforma *PubMed* não foram identificadas outras publicações onde esta variante tenha sido identificada.

Devido a sua raridade e a sua identificação em nossa população foi decidido incluir essa alteração na análise molecular dos pacientes por digestão com enzima de restrição no LGMH. Todas as famílias incluídas na amostra (45 indivíduos/40 famílias) estão sendo analisadas para esta variante e estudos preliminares indicam que a prevalência desta variante na população alagoana é de 18,97%, sendo a segunda variante mais prevalente na nossa amostra com diagnóstico molecular elucidado até o presente momento (29 indivíduos/25 famílias).

Com base nesta alta frequência de uma alteração não derivada do pseudogene na população alagoana surgiu a proposta de elaborar um artigo que discuta sobre um possível efeito fundador regional.

Neste sentido, o título provisório para esse artigo seria: *High prevalence of an uncommon pathogenic variant of CYP21A2 in Alagoas*

6. CONCLUSÃO

Esta pesquisa consistiu na unificação dos dados dos pacientes com HAC atendidos no SUS em Alagoas a partir de casos oriundos do Ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL e do SRTN/MESM/UNCISAL incorporado no PNTN em Alagoas. Os dois serviços atuam de maneira independente, com eventuais intercâmbios de pacientes até a presente pesquisa. Os resultados dessa unificação permitem concluir que a mediana de idade em 1 ano reflete ainda a predominância de pacientes provenientes do ambulatório do SGC/HUPAA/UFAL. A medida em que a triagem neonatal cresça e mais pacientes do PNTN sejam incluídos no banco de dados unificado, a tendência é que essa mediana decresça, chegando no período neonatal, que é o esperado.

Foi evidenciado que os pacientes provenientes do interior do Estado são mais prevalentes, revelando uma necessidade urgente de descentralização de serviços de referência nas demais macrorregiões de Alagoas.

O óbito de um paciente com triagem positiva, antes de receber o resultado do teste, demonstra a necessidade de revisão do fluxo de coleta de amostra – envio ao laboratório – convocação do paciente, para que aconteça em tempo hábil de maneira a evitar desfechos negativos, pois esta é uma das razões para a inclusão da HAC no PNTN.

Corroborando a literatura, a variante c.290-13A/C>G, que se traduz habitualmente na forma Perdedora de Sal, foi a variante mais prevalente na amostra, com alguma divergência em sua correlação genótipo-fenótipo, também descrita na literatura devido a formação de alguns transcritos que produzem pequenas quantidades de enzima, podendo gerar apresentações mais brandas como a forma Virilizante Simples. Esta é uma das razões pela qual a correlação genótipo-fenótipo geral é variável na literatura, sendo a da presente amostra de 65,5%.

A alteração nova p.Ser301Pro foi encontrada em homozigose nas duas irmãs, filhas de pais consanguíneos. A PCR-AE para investigação da variante p.Ser301Pro foi padronizada no LGMH, o que possibilitou sua identificação em um primo de primeiro grau pelo lado materno.

Além disso, a alta frequência da variante p.Ser170Lysfs*125, considerada rara por não ser derivada do pseudogene, presente em famílias não relacionadas e distantes entre si, levantou a possibilidade de um possível efeito fundador a ser investigado em pesquisas futuras.

Assim, os resultados obtidos permitiram ampliar o conhecimento geral acerca dos casos de HAC atendidos no SUS em Alagoas, propiciar caminhos para novas pesquisas na área, traçar planos individuais para melhorar a assistência à saúde desses pacientes e levantar informações

que poderão contribuir para a construção de políticas públicas voltadas a estes pacientes e suas famílias, bem como melhorar as já existentes.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

A principal limitação desta pesquisa foi o acesso aos pacientes assistidos pelo SRTN, devido às dificuldades de estrutura física da Casa do Pezinho, dificuldade de contato com os pacientes e atendimento e coleta de material biológico. A incorporação de todos os pacientes triados poderá trazer modificações no perfil sociodemográfico e genético destes pacientes.

Outra limitação encontrada foi sobre o estudo de segregação dos pacientes, que não foi possível em todos os casos. Em algumas famílias, a coleta de amostra em um dos genitores não foi realizada por motivo de falta na consulta, óbito ou recusa. Nos dois pacientes adultos e nos gêmeos adotados não foi colhida amostra de nenhum dos genitores.

A não conclusão da análise molecular de todos os pacientes foi outra uma limitação deste estudo, pois também poderá modificar o perfil molecular da HAC em Alagoas. Quatro pacientes tiveram apenas um alelo identificado pela PCR-AE, com perspectiva de serem sequenciados, além das outras seis famílias que não tiveram variante identificada em nenhum dos alelos. Um paciente teve variante do alelo materno identificada, com perspectiva de realização de MLPA para o encontro de conversão ou deleção no alelo paterno.

Apesar destas limitações, a pesquisa tem perspectiva de se perpetuar no esforço de manter o banco de dados atualizado, com a unificação dos dados dos pacientes atendidos nos dois serviços de referência em HAC no SUS em Alagoas, visto que o coordenador do SRTN faz parte da equipe multidisciplinar do ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL. Deste modo, os pacientes triados no teste do pezinho terão acesso ao diagnóstico molecular, o que permitirá um aconselhamento genético mais adequado e um melhor planejamento terapêutico por parte da equipe.

Este estudo fez parte do projeto Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar pelo Programa de Pesquisas para o SUS - PPSUS (2021-2023), com conclusão do ciclo em outubro deste ano. Além desta pesquisa, estavam previstas capacitações de residentes de pediatria e equipes de saúde da família para o reconhecimento e referência destes pacientes, com o intuito de melhorar a assistência e promover uma descentralização da atenção aos pacientes com HAC no SUS em Alagoas. No entanto, em maio de 2022 o Laboratório de Citogenética Humana da UNCISAL (LCH/UNCISAL), o único no estado de Alagoas que realiza o exame de cariótipo, reportou problemas de estrutura física e de equipamentos que inviabilizaram a continuidade da realização destes exames, que são elementares e essenciais para os casos de ambiguidade genital na HAC. O LCH é parceiro do SGC/HUPAA/UFAL e, desde o início do ambulatório de DDS, em 2008,

é o responsável pela realização dos cariótipos dos pacientes, sendo também o laboratório responsável pela realização dos exames dos pacientes do PPSUS. Até o presente, o LCH encontra-se parado, impossibilitado de manter a atividade devido aos problemas de equipamento e de estrutura, que não foram solucionados. Desta forma, como as capacitações tendem a aumentar a demanda de pacientes, e o atendimento de novos pacientes requer disponibilização do cariótipo, as capacitações foram suspensas. O ambulatório de DDS do SGC/HUPAA/UFAL segue atendendo casos novos com realização de cariótipo em laboratório externo com verba de pesquisas, até que o problema do LCH seja resolvido.

REFERÊNCIAS

ALAGOAS. Casa do Pezinho - **Serviço de Referência de Triagem Neonatal – Alagoas (SRTN – AL)**. Disponível em: <https://alagoasdigital.al.gov.br/servico/1458>. Acesso: 15/10/2022

ALAGOAS. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL). **Divulgação do resultado final do julgamento**. Chamada FAPEAL 06/2020 – PPSUS - Programa Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em Saúde - Decit-SCTIE-MS/CNPq/ FAPEAL/ SESAUAL. Disponível em: https://www.fapeal.br/wp-content/uploads/2021/04/DIVULGACAO-DO-RESULTADO-FINAL-PPSUS-2020_23-04-2021.pdf. Acesso: 03/11/2022

ALAGOAS. **Região Metropolitana de Maceió**. Disponível em: <https://regiaometropolitana.al.gov.br/sobre-a-rmm/>. Acesso: 02/11/2022

ALAGOAS. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Portaria nº 280, de 4 de abril de 2014**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sas/Links%20finalizados%20SAS%202014/prt0280_04_04_2014.html. Acesso: 20/10/2022

ASSUNÇÃO, I.V.; GOMES, E.A.P.; ZANOTTI, S.V.; REZENDE, F.R.M.; MONLLEÓ, I.L. Escuta clínica em um ambulatório de genética: uma experiência extensiva. **Est. Inter. Psicol.** [online]. 2020, vol.11, n.3, pp. 218-231. ISSN 2236-6407. <http://dx.doi.org/10.5433/2236-6407.2020v11n3p218>.

AUCHUS, R.J. *et al.* Crinecerfont Lowers Elevated Hormone Markers in Adults With 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab.** 2022 Mar; 107(3): 801–812.

BAGOLIN, I.P.; SALATA, A; MATTOS, E.J. **Pobreza Social no Brasil: 2012-2021**. Laboratório de Desigualdades, Pobreza e Mercado de Trabalho – PUCRS Data Social. Porto Alegre, 2022. Disponível em: https://www.pucrs.br/datasocial/wp-content/uploads/sites/300/2023/02/Estudo-Pobreza-Social-19.01_final.pdf. Acesso: 03/10/2023

BILLERBECK, A.E. *et al.* Three Novel Mutations in CYP21 Gene in Brazilian Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency Due to a Founder Effect. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 87(9):4314–4317, 2002

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Alagoas**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/panorama>. Acesso: 10/09/2022

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA ECONOMIA. **Pesquisa nacional de saúde 2019**: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde: Brasil, grandes regiões e unidades da federação / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101748.pdf>. Acesso: 07/10/2022

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html. Acesso: 20/10/2022

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt2829_14_12_2012.html. Acesso: 20/10/2022

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional da Triagem Neonatal**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/pntn>. Acesso: 10/09/2022

BRASIL. MS/SVS/CGIAE - **Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos - SINASC**. DATASUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Acesso: 03/10/2023

BRUNDISINI, F.; GIACOMINI, M.; DEJEAN, D.; VANSTONE, M.; WINSOR, S.; SMITH, A. Chronic disease patients' experiences with accessing health care in rural and remote areas: a systematic review and qualitative meta-synthesis. **Ont Health Technol Assess Ser**. 2013 Sep 1;13(15):1-33. eCollection 2013.

COUTINHO, M.F.G. Crescimento e desenvolvimento na adolescência. **Revista de Pediatria SOPERJ**. 2011;12(supl 1)(1):28-34

COX, E.; AWE, M.; SABU, S.; TUMIN, D.; AKPAN, U.S. Does greater distance from the hospital exacerbate socioeconomic barriers to neonatal intensive care unit clinic attendance? **J Rural Med**. 2023 Apr; 18(2): 55–61. doi: 10.2185/jrm.2022-035

DAMIANI, D. *et al.* Genitália ambígua: diagnóstico diferencial e conduta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 1, p. 37–47, fev. 2001

EL-MAOUCHE, D.; ARLT, W.; MERKE, D.P. Congenital adrenal hyperplasia. **Lancet**. 2017; 390: 2194–2210

FUTUYMA D.J. **Biologia evolutiva**. 2nd ed. Ribeirão Preto: SBG, 1992, 631 p

GAZZANEO, I.F.P. *et al.* Profile of patients with genitourinary anomalies treated in a clinical genetics service in the Brazilian unified health system. **Rev Paul Pediatr**. 2016; 34(1):91-98

GIUGLIANI, L. *et al.* Clinical research challenges in rare genetic diseases in Brazil. **Genet. Mol. Biol**. 42 (1 suppl 1), 2019

HANNAH-SHMOUNI, F.; CHEN, W.; MERKE, D.P. Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2009 Apr; 23(2): 181–192.

HUGHES, I.A. Disorders of sex development: a new definition and classification. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. Vol. 22, No. 1, pp. 119–134, 2008

HUGHES, I.A.; HOUK, C.; AHMED, S.F.; LEE, P.A.; LWPES1/ESPE2 CONSENSUS GROUP. Consensus statement on management of intersex disorders. **Archives of Disease in Childhood**. 91(7), 554-563, 2006.

KOCOVA, M.; CONCOLINO, P.; FALHAMMAR, H. Characteristics of In2G Variant in Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. **Front. Endocrinol.**, 24 January 2022

KOZUKI, C.G.; STEINER C.E. Consanguinity and Geographic Origin of Patients With Autosomal Recessive Metabolic Disorders Evaluated in a Reference Service in Campinas, Brazil. **Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening**, 2015.

KRONE, N. *et al.* Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2000, 85(3): 1059–1065

KRONE, N.; ARLT, W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, 2009, 23(2): 181–192.

KURTOĞLU, S.; HATIPOĞLU, N. Non-Classical Congenital Adrenal Hyperplasia in Childhood. **J Clin Res Pediatr Endocrinol** 2017;9(1):1-7

LEMOS-MARINI, SHV; MELLO, MP. Hiperplasia adrenal congênita. *Em: MACIEL-GUERRA, AT; GUERRA JÚNIOR, G. Menino ou Menina? Os distúrbios da diferenciação de sexo.* Vol 1. 3rd ed. Curitiba: Appris, 2019. p 193-222

MAKIYAN, Z. Systematization of ambiguous genitália. **Organogenesis**. 2016; 12(4): 169–182. doi: 10.1080/15476278.2016.1210749.

MARINO, S. *et al.* Molecular analysis of the CYP21A2 gene in dried blood spot samples. **Medicina (B Aires)**. 2020;80(3):197-202.

MASSENBURG, B.B.; JENNY, H.E.; SALUJA, S.; MEARA, J.G.; SHRIME, M.G.; ALONSO, N. Barriers to Cleft Lip and Palate Repair Around the World. **J Craniofac Surg**. 2016 Oct;27(7):1741-1745. doi: 10.1097/SCS.0000000000003038.

MELLO, M.P. *et al.* Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 46 (4).Ago 2002. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000400017>

MERKE, D.P.; AUCHUS, R.J. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. **N Engl J Med.** 2020; 383:1248-61

MERKE, D.P; BORNSTEIN, S.R. Congenital adrenal hyperplasia. **Lancet.** 2005; 365: 2125–36

MICHELATTO, D.P. **Functional Importance of Novel Nucleotide Variations in The CYP21A2 Gene**, Campinas, 2016, p1-109. Tese de doutorado.

NARASIMHAN, M.L.; KHATTAB, A. Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. **Fertility and Sterility**, Vol. 111, No. 1, January 2019

NERMOEN, I. *et al.* Classic congenital adrenal hyperplasia. **Tidsskr Nor Legeforen.** 2017; 137:540 – 3

NEW, M.I. *et al.* Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. **Proc Nat Acad Sci U S A.** 2013; 110: 2611-2616

NIMKARN, S. *et al.* 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. **GeneReviews [Internet].** February 4, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>. Acesso: 05/11/2022

PIGNATELLI, D. *et al.* The Complexities in Genotyping of Congenital Adrenal Hyperplasia: 21-Hydroxylase Deficiency. **Front. Endocrinol.**, 04 July 2019

PRADER, A.; GURTNER, H.P. The syndrome of male pseudohermaphroditism in congenital adrenocortical hyperplasia without overproduction of androgens (adrenal male pseudohermaphroditism). **Helvetica Paediatrica Acta**, 01 Aug 1955, 10(4):397-412

QUIGLEY, C.A. *et al.* Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocrine reviews**, v. 16, n. 3, p. 271–321, jun. 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989

SCHRECK, R. R.; DISTÈCHE, C. M. Chromosome banding techniques. **Current protocols in human genetics**, v. Chapter 4, n. 1, p. Unit4.2, maio 2001

SILVA, M.G.; PETROLI, R.J.; MONLLEÓ, I.L.; ZANOTTI, S.V. Reunião clínica de distúrbios/diferenças do desenvolvimento do sexo durante a pandemia do covid-19: uma experiência de trabalho remoto multidisciplinar. In: **Os desafios e inovações da extensão universitária na área de saúde em tempo de COVID-19 [recurso eletrônico]** / Cristiana Carina de Barros Lima Dantas Bittencourt... [et al.] [organizadores]. – Maceió, AL : EDUFAL, 2022. 463 p. : il. ISBN 978-65-5624-113-5.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Guia Prático de Atualização: **Hiperplasia Adrenal Congênita: triagem neonatal**. Departamento Científico de Endocrinologia: Outubro de 2019. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/22106c-GPA_-_Hiperplasia_Adrenal_Congenita-TriagemNeonatal.pdf. Acesso: 15/10/2022

SPEISER, P.W. *et al.* Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. 2018 Nov 1;103(11):4043-4088. doi: 10.1210/jc.2018-01865.

TURCU, A.F.; AUCHUS, R.J. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. **Endocrinol Metab Clin North Am**. 2015 Jun; 44(2): 275–296.doi: 10.1016/j.ecl.2015.02.002

WHITE, P.C. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. **Nat Rev Endocrinol** 2009;5:490-8

WITCHEL, S.F. Congenital Adrenal Hyperplasia. **J Pediatr Adolesc Gynecol**. 2017 Oct; 30(5): 520–534. doi: 10.1016/j.jpag.2017.04.001

WITCHEL, S.F.; AZZIZ, R. Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia. **International Journal of Pediatric Endocrinology**, 2020. doi:10.1155/2010/625105

ZANOTTI, S.V.; MONLLEÓ, I.L. Psicanálise e genética: uma experiência de interlocução no SUS. In: RUDGE, A.M.; BESSET, V. (Org.). **Psicanálise e outros saberes**. Rio de Janeiro: Cia de Freud, 2012. p. 249-267.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) – para responsáveis (autorização)

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, presentes nas instituições que realizam pesquisas. Foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas, incluindo pesquisas com seres humanos, visa salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante da pesquisa.

Eu, _____, responsável _____ por _____ autorizo sua participação como voluntário no estudo realizado no Hospital Universitário da Prof. Alberto Antunes – Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL), intitulado: “Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar”. Recebi de Reginaldo José Petroli/Isabella Lopes Monlleó/Marshall Ítalo Barros Fontes/Reinaldo Luna de Omena Filho/Camila Maia Costa de Queiroz Souto, responsáveis pela execução da pesquisa, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a conhecer as características clínicas e as causas dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo.
- Que a importância deste estudo é reconhecer as especificidades desses distúrbios na população de Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são: conhecer as características demográficas e genético-clínicas de DDS na população de Alagoas, bem como as implicações desse tipo de distúrbio genético.
- Que esse estudo começará em maio de 2021 e terminará em maio de 2026.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: coleta de dados clínicos e familiares por meio de entrevista, exame físico por médico geneticista e atendimento psicológico. Essa etapa será realizada durante consulta ambulatorial, no serviço de genética clínica do HUPAA-UFAL, previamente agendada, com duração de aproximadamente 60 minutos. Para auxiliar a elucidação diagnóstica e aconselhamento genético, será realizado:
 - heredograma, para identificar os indivíduos na família;
 - cariótipo, para determinar a constituição cromossômica;
 - Exames hormonais para estabelecimento do perfil hormonal;
 - Ultrassonografia abdominal como exame de imagem do trato genito-urinário;
 - Exames moleculares, para identificar possíveis alterações no material genético.
 (Para a realização dos exames moleculares, o material biológico do participante da pesquisa poderá ser enviado para a Universidade Estadual de Campinas - São Paulo ou outro laboratório particular, com única e exclusiva finalidade de realização de exames que não são realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL. Após a

utilização do material biológico, o mesmo será descartado).

- Que meu/minha filho(a) participará das seguintes etapas: atendimento clínico, entrevista e exames de cariótipo, hormonais, imagem e moleculares.
- Que não há outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que ele(a) poderá sentir com a participação são: durante a coleta de sangue, que será utilizado para o exame de cariótipo, hormonal e molecular, meu/minha filho(a) poderá sentir dor no local da picada da agulha. Depois poderão surgir manchas roxas no mesmo local. Em todas essas situações, me foi garantido que a equipe tomará as providências para que estes incômodos sejam mínimos.
- Que ele(a) deverá contar com assistência dos responsáveis pela pesquisa, caso tenha dúvidas em relação a mesma, podendo entrar em contato com eles através dos telefones cujo números encontram-se adiante neste documento.
- Que os benefícios que ele(a) deverá esperar com sua participação são a definição do seu diagnóstico, tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são: contribuição para o maior entendimento sobre os casos de DDS em Alagoas e o aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento das pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.
- Que seremos informados sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar:
 - Serão fornecidos esclarecimentos sobre as etapas do estudo;
 - A qualquer momento poderei me recusar a continuar participando da pesquisa e, também, que poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da participação do meu/minha filho(a) não permitirão identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só serão feitas entre os profissionais estudiosos do assunto.
- Que eu não terei qualquer despesa com a participação do meu/minha filho(a) nesse estudo e, que poderei ser indenizado por danos que venha a sofrer pela mesma razão.
- Que eu receberei uma via assinada do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Finalmente, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a participação do meu/minha filho(a) no mencionado estudo e estando consciente dos nossos direitos, das nossas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que essa participação implica, concordo e autorizo a participação do meu/minha filho(a) nesse estudo e, portanto, **DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO(A) OU OBRIGADO(A).**
- Este TCLE será impresso em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que serão assinadas ao final pelo participante da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS no 466 de 2012, item IV.5.d)

<p>Endereço do(a) participante: Domicílio: (rua, praça, conjunto): Bloco: /Nº: /Complemento: Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone: Ponto de referência:</p>
<p>Contato de urgência: Prof. Dr. Reginaldo José Petroli/ Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó/ Prof. Dr Marshall Ítalo Barros Fontes/ Prof. Dr Reinaldo Luna de Omena Filho/ Profa. Dra. Camila Maia Costa de Queiroz Souto. Endereço: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões. Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970. Telefone p/contato: (82)32023896 / (82)32023774</p>
<p>Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO): Universidade Federal de Alagoas - Faculdade de Medicina Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970</p>
<p>ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pertencente à Universidade Federal de Alagoas. Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária. Tel.: 32141041 E-mail: comitedeetica@ufal.br.</p>

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) participante da pesquisa.	Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) – para participantes da pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, presentes nas instituições que realizam pesquisas. Foi criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas, incluindo pesquisas com seres humanos, visa salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do participante da pesquisa.

Eu, _____ aceito participar como voluntário do estudo realizado no Hospital Universitário da Prof. Alberto Antunes – Universidade Federal de Alagoas (HUPAA-UFAL), intitulado: “Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar”. Recebi de Reginaldo José Petroli/Isabella Lopes Monlleó/Marshall Ítalo Barros Fontes/Reinaldo Luna de Omena Filho/Camila Maia Costa de Queiroz Souto, responsáveis pela execução da pesquisa, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a conhecer as características clínicas e as causas dos Distúrbios da Diferenciação do Sexo.
- Que a importância deste estudo é reconhecer as especificidades desses distúrbios na população de Alagoas.
- Que os resultados que se desejam alcançar são: conhecer as características demográficas e genético-clínicas de DDS na população de Alagoas, bem como as implicações desse tipo de distúrbio genético.
- Que esse estudo começará em maio de 2021 e terminará em maio de 2026.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: coleta de dados clínicos e familiares por meio de entrevista, exame físico por médico geneticista e atendimento psicológico. Essa etapa será realizada durante consulta ambulatorial, no serviço de genética clínica do HUPAA-UFAL, previamente agendada, com duração de aproximadamente 60 minutos. Para auxiliar a elucidação diagnóstica e aconselhamento genético, será realizado:
 - heredograma, para identificar os indivíduos na família;
 - cariótipo, para determinar a constituição cromossômica;
 - Exames hormonais para estabelecimento do perfil hormonal;
 - Ultrassonografia abdominal como exame de imagem do trato genito-urinário;
 - Exames moleculares, para identificar possíveis alterações no material genético. (Para a realização dos exames moleculares, o material biológico poderá ser enviado para a Universidade Estadual de Campinas
- São Paulo ou outro laboratório particular, com única e exclusiva finalidade de realização de exames que não são realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do HUPAA/UFAL. Após a utilização do material biológico, o mesmo será descartado).
- Que participarei das seguintes etapas: atendimento clínico, entrevista e exames de cariótipo, hormonais, imagem e moleculares.
- Que não há outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados.
- Que os incômodos que posso sentir com minha participação são: durante a coleta de sangue, que será utilizado para exame de cariótipo, hormonal e molecular, posso sentir dor no local da picada da agulha. Depois poderão surgir manchas roxas no mesmo local. Em todas essas situações, me foi garantido que a equipe tomará as providências para que estes incômodos sejam mínimos.
- Que devo contar com assistência dos responsáveis pela pesquisa, caso tenha dúvidas em relação a

mesma, podendo entrar em contato com eles através dos telefones cujo números encontram-se adiante neste documento.

- Que os benefícios que devo esperar com minha participação são: diagnóstico, tratamento, aconselhamento genético e atendimento psicológico. Além disso, os benefícios indiretos são: contribuição para o maior entendimento sobre os casos de DDS em Alagoas e o aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento das pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.

- Que serei informado sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar:

- Serão fornecidos esclarecimentos sobre as etapas do estudo;

- A qualquer momento poderei me recusar a continuar participando da pesquisa e, também, que poderei retirar meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;

- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão identificação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que as divulgações das mencionadas informações só serão feitas entre os profissionais estudiosos do assunto.

- Que eu não terei qualquer despesa com minha participação nesse estudo e, que poderei ser indenizado por danos que venha a sofrer pela mesma razão.

- Que eu receberei uma via assinada do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- Finalmente, tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos nossos direitos, das nossas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que essa participação implica, concordo em participar desse estudo e, portanto, DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO(A) OU OBRIGADO(A).

- Este TCLE será impresso em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que serão assinadas ao final pelo participante da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS no 466 de 2012, item IV.5.d)

Endereço do(a) participante:

Domicílio: (rua, praça,

conjunto): Bloco: /Nº:

/Complemento: Bairro:

/CEP/Cidade: /Telefone: Ponto
de referência:

Contato de urgência: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí/ Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó/ Prof. Dr. Marshall Ítalo Barros Fontes/ Prof. Dr. Reinaldo Luna de Omena Filho/ Profa. Dra. Camila Maia Costa de Queiroz Souto. Endereço: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes/Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões. Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL, Brasil, CEP: 57072-970. Telefone p/contato: (82)32023896 / (82)32023774

Endereço d(os,as) responsáve(l,is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):

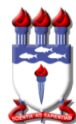
Universidade Federal de Alagoas - Faculdade de Medicina

Avenida Lourival Melo Mota S/N, Bairro: Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL,
Brasil, CEP: 57072-970

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), pertencente à Universidade Federal de Alagoas. Campus A.C. Simões S/no. Cidade Universitária. Tel.: 32141041 E-mail: comitedeetica@ufal.br.

Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) participante da pesquisa.	Nome e Assinatura do(s) responsável(eis) pelo estudo

APÊNDICE B – Protocolo genético-clínico do ambulatório DDS

**SERVIÇO DE GENÉTICA CLÍNICA**
AMBULATÓRIO DDS - PROTOCOLO GENÉTICO-CLÍNICO

REG DDS:

REG HUPAA:

DATA:

I – IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo atribuído pela família: () Masculino () Feminino ()

Nenhum

Registro civil: () Não . Como a criança é chamada pelos pais: _____

() Sim

Forma de acesso ao Serviço:

() Demanda espontânea. Encaminhado por (especialidade):

() Outra. Especifique:

II – DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Naturalidade (cidade e UF):

Procedência (cidade e UF):

Nome da mãe, data de nascimento e idade atual:

Município de nascimento da mãe:

Nome do pai, data de nascimento e idade atual:

Município de nascimento do Pai:

Endereço completo e telefones para contato (especificar de quem é o contato registrado):

Zona Urbana Zona Rural

Escolaridade da mãe:

Não alfabetizada Ensino fundamental incompleto Ensino fundamental completo

Ensino médio incompleto Ensino médio completo Ensino superior incompleto

Ensino superior completo Curso técnico Sem informação

Escolaridade do pai:

Não alfabetizado Ensino fundamental incompleto Ensino fundamental completo

Ensino médio incompleto Ensino médio completo Ensino superior incompleto

Ensino superior completo Curso técnico Sem informação

Renda familiar:

Sem rendimento fixo. Valor médio mensal: _____

Rendimento fixo. Valor mensal: _____

III – QUEIXA(S):

Ambiguidade genital

Hipospadia Micropênis Criptorquidia

Ginecomastia

Clitoromegalia Fusão labial Virilização

Puberdade precoce

Infertilidade Amenorréia primária Hipodesenvolvimento sexual secundário

Gônadas palpáveis em pessoa aparentemente do sexo feminino

Outro(s). Especifique:

IV – HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

V - ANTECEDENTES GESTACIONAIS, DO PARTO E DO PERÍODO NEONATAL

Usou Testosterona e derivados (Danazol); progesterona e derivados (19-nortestoterona, noretindrona, estirona e o noretinodrel); Tamoxifeno; Clomifeno; Dietilestilbestrol:

Não SI Sim. Especifique:

Parto: Pré-Termo (<37 sem) Termo (37-42 sem) Pós-termo (>42 sem)

Peso: Comprimento: PC: Apgar:

Foi internado no período neonatal?

Recebeu alta após quantos dias do nascimento?

Teste do Pezinho:

Sim. Descrever resultados, se anormais (anotar valor de referência, data do resultado)

Não

VI - RECORRÊNCIA FAMILIAL DE:

Sem recorrência Ambiguidade genital

Hipospadia Micropênis Criptorquidia Ginecomastia

Clitoromegalia Fusão labial Virilização ()

Puberdade precoce

Infertilidade Atraso puberal Amenorréia primária

Hipodesenvolvimento sexual secundário

Gônadas palpáveis em pessoa aparentemente do sexo feminino

VII - HEREDOGRAMA (mínimo 3 gerações – pais, irmãos, avós - em todos os casos)

VIII – EXAME FÍSICO GERAL:

PC: **Altura:** **Envergadura:** **Peso:**

Descrição dos Achados:

IX - EXAME FÍSICO DIRIGIDO:**Manifestações Genitais**

() Genitália ambígua

PRADER: () P1 () P2 () P3 () P4 () P5

QUIGLEY: () Q1 () Q2 () Q3 () Q4 () Q5 ()
) Q6/7

() Genitália de aparência feminina () Genitália de
aparência masculina

() Genitália hipoplásica (masculina e feminina) () Genitália
malformada

Localização do meato uretral: () tópica () Hipospádia glandar
Hiperpigmentação em genitália: () Não () Sim

Comprimento do falo/clitóris/pênis esticado(mm):

Diâmetro do falo/clitóris/pênis (mm):

() Micropênis

Gônada palpável:

() Não

() Sim. A **DIREITA** tem volume (orquidômetro):

Localização:

() Sim. A **ESQUERDA** tem volume (orquidômetro):

Localização:

Desenvolvimento mamário (TANNER): () M1 () M2 () M3 () M4 () M5

Desenvolvimento genital (TANNER): () G1 () G2 () G3 () G4 () G5

Desenvolvimento pelos (TANNER): () P1 () P2 () P3 () P4 () P5

Manifestações Associadas:

() Hipodesenvolvimento Sexual Secundário () Hiposmia/Anosmia ()
Ginecomastia

() Baixa Estatura () Amenorréia Primária () Virilização

() Surdez

() Sincinesia bimanual () Heterocromia de Íris

() Outras anormalidades: _____

X – REGISTRO FOTOGRÁFICO: () Não () Sim
XI – EXAMES LABORATORIAIS PRÉVIOS OU SOLICITADOS NA 1ª CONSULTA:

PREENCHER APÓS A CONSULTA

XII – SUMÁRIO DOS FATORES DE RISCO

Consanguinidade parental: () Não () SI () Sim. Especifique:

Mãe ≥ 35 anos (no momento da concepção): () Não () SI () Sim

Pai ≥ 40 anos (no momento da concepção): () Não () SI () Sim

Recorrência familiar do distúrbio: () Não () SI/Duvidoso
() Sim

Ocorrência familiar de outro DC: () Não () SI/Duvidoso () Sim

Exposição teratogênica: () Não () SI/Duvidoso () Sim

XIII – MANIFESTAÇÕES ASSOCIADAS DETECTADAS EM EXAMES COMPLEMENTARES:

() Derivados de Muller () Derivados de Wolff ()

Agenesia/Malformações do TGU

() Agenesia de gônadas () Coarctação de aorta ()

Outras: _____

XIV – CLASSIFICAÇÃO DO DISTÚRPIO:

() DDG () DDS XX () DDS XY () Formas não classificadas () DGU

XV – DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO:

() Cromossômico () Monogênico

XVI – DIAGNÓSTICO SINDRÔMICO:

() DDG associado a anomalias dos cromossomos sexuais

() DDG não associado a anomalias dos cromossomos sexuais

() Deficiência do HAM ou de seu receptor () Distúrbios da síntese ou ação dos andrógenos

() Excesso de andrógenos () Defeito geniturinário sindrômico () Defeito geniturinário isolado

() Outro (especificar):

XVII – TIPO DE ACOMPANHAMENTO

É paciente índice? () Sim () Não. Qual relação com índice?

É caso familiar? () Não () Sim. Quem?

É casal? () Não () Sim. Quem?

XVIII – COLETOU AMOSTRA PARA MOLECULAR?

() Sim () Sim + genitores () Não

XIX – DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO:

XX – SITUAÇÃO DO DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO: () Suspeito ()
Conclusivo

**XXI – SE O DIAGNÓSTICO NOSOLÓGICO FOR CONCLUSIVO, QUAL A
EVIDÊNCIA?**

() Cariótipo () Histopatológico () Testes
moleculares

() Outro. Qual?

OUTROS DADOS RELEVANTES:

Responsável pelo preenchimento

HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS:

CONSULTAS DE SEGUIMIENTO

Data:

APENDICE C – Arquivo suplementar do artigo *Clinical profile and molecular epidemiology of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in two reference Brazilian services*

SUPPLEMENTARY FILE

Supplementary file Table 1: Total CAH incidence and per based on data on live births and patients with neonatal screening carried out by the SUS in Alagoas

Year	Live births (AL)	Neonatal screenings performed (AL)	population coverage of neonatal screening PNTN/AL	CAH screened	CAH incidence (AL)
2016	48.164	42.128	87,5%	6	1:8334
2017	50.368	44.890	89,1%	5	1:10000
2018	52.496	47.243	90,0%	5	1:10000
2019	49.803	45.227	90,8%	4	1:11100
2020	48.341	43.143	89,2%	4	1:12500
2021	48.808	45.920	94,0%	6	1:10000
TOTAL (SIX YEARS)	297.980	268.551	90,1%	30	1:10000

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Título da Pesquisa: Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: da atenção primária ao diagnóstico etiológico e tratamento multidisciplinar

Pesquisador: Reginaldo José Petroli

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;)

Versão: 2

CAAE: 40078620.4.0000.5013

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.598.307

Apresentação do projeto:

Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) são condições congênitas complexas, onde o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal e anatômico é atípico. A avaliação multidisciplinar de pessoas com DDS é tarefa fundamental e indispensável para o correto diagnóstico e melhor prognóstico das famílias afetadas. Em Alagoas, a atenção dos casos de DDS por equipe multidisciplinar iniciaram em 2008, o que possibilitou o atendimento de aproximadamente 250 famílias até o presente. da iniciativa de professores dos cursos de Psicologia e Medicina da Universidade Federal de Alagoas e UNCISAL, respectivamente. Em 2009-2011, a primeira investigação no âmbito do Programa de Pesquisas para o SUS (PPSUS), “Atenção integrada em saúde a pacientes com ambiguidade genital em hospital terciário do SUS em Alagoas” (ZANOTTI, 2011) analisou os resultados de uma proposta de atendimento clínico integrado a participantes da pesquisa com quadro de anormalidade genital. Os resultados demonstraram que a interlocução entre os profissionais estruturou, sistematizou e padronizou a rotina de

atendimento integrado no ambulatório de genética e possibilitou uma prática clínica menos fragmentada e orientada pela especificidade de cada caso. Em 2013-2015, a segunda pesquisa no âmbito do PPSUS, “Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: abordagem clínica no SUS” (ZANOTTI, 2015) propôs a ampliação do primeiro estudo, para abranger casos de DDS que se manifestam como alterações da diferenciação sexual secundária e da fertilidade. Assim, ampliou o número e o recorte diagnóstico da base de dados criada na pesquisa anterior, e abarcou os DDS com alterações dos cromossomos sexuais – 47,XXY (Síndrome de Klinefelter), 45,X (Síndrome de Turner), 45,X/46,XY (Disgenesia gonadal mista) e 46,XX/46,XY (quimerismo). Esse estudo possibilitou, na interface da medicina com a psicologia, a caracterização clínica e etiológica de pessoas com DDS atendidas no SGC/HUPAA-UFAL; a análise dos efeitos subjetivos do diagnóstico para os participantes da pesquisa, especialmente no que se refere à diferença sexual, à angústia e à relação que estabelecem com o próprio corpo. Além disso, auxiliou a manutenção do serviço de referência no Estado de Alagoas para pessoa com DDS, ao viabilizar a realização de exames essenciais para a investigação diagnóstica, como o cariótipo, e, a atenção integrada em saúde por médicos e psicólogos. A última pesquisa no PPSUS, “Caracterização de Distúrbios da diferenciação do sexo em Alagoas: uma abordagem multidisciplinar no SUS” (ZANOTTI, 2018) tomou os resultados das pesquisas anteriores como referenciais e propôs uma outra ampliação: o aporte multidisciplinar dos aspectos clínicos e laboratoriais. Novamente na interface da medicina com a psicologia, a equipe técnica foi constituída por profissionais/pesquisadores de três Universidades distintas e de diferentes especialidades: genética clínica; genética molecular; endocrinopediatria; citogenética e psicologia. A partir da investigação diagnóstica; dos resultado dos exames laboratoriais e da decisão tomada a partir do mesmo; das falas dos participantes da pesquisa sobre o diagnóstico de distúrbios da diferenciação do sexo e os impasses da puberdade, foi possível ampliar o conhecimento sobre as características demográficas, clínicas e etiológicas de DDS na população de Alagoas, bem como a particularidade da puberdade em casos de Distúrbios da Diferenciação do Sexo e suas implicações. A presente proposta visa a continuidade das ações de saúde relacionadas aos DDS, tomando como referência as experiências das edições PPSUS acima citadas, propõe a manutenção do atendimento integrado e parcerias intra e interinstitucionais, além de ampliar os cenários de atendimento para o Programa Nacional de Triagem Neonatal de Alagoas e Núcleo de Atenção à Saúde da Família da capital e interior e interior do estado. Trata-se de pesquisa observacional com amostra a

ser constituída por pessoas com suspeita de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS), em qualquer idade, com ou sem anormalidades genitais. Com base na taxa de nascimentos em Alagoas, na prevalência de DDS e na demanda espontânea ao SGC/HUPAA-UFAL, estima-se a inclusão de 50 casos. Durante a realização do projeto, será associado à prática médica de consulta ambulatorial e acolhimento com equipe da psicologia. O primeiro passo da investigação laboratorial do diagnóstico consistirá na realização de exame de cariótipo para todos os participantes da pesquisa. Esta etapa será realizada na Uncisal, utilizando as técnicas de bandamento G (Giemsa). A partir do cariótipo serão realizados: (1) perfil hormonal (eixo hipotálamohipófise-gônadas/supra-renais) e (2) ultrassonografia do trato geniturinário (3) exame molecular, conforme indicação, como por exemplo: Reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento pelo método Sanger, MLPA, Sequenciamento de exoma. Para os exames moleculares, será extraído o DNA dos participantes da pesquisa, através da técnica fenólica já implantada no Serviço de genética clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da UFAL (SGC/HUPAA/UFAL). Os DNAs extraídos serão utilizados para a elucidação etiológica dos casos triados pela casa do pezinho para a hiperplasia adrenal congênita (HAC) e dos casos novos atendidos no SGC/HUPAA/UFAL. Abordagens inovadoras para o diagnóstico dos casos de DDS são fundamentais para a elucidação diagnóstica. Nesse sentido, após avaliação de cada caso por equipe multidisciplinar, composta por especialistas com ampla expertise no assunto, será traçada e estratégia para a elucidação etiológica dos casos novos e dos casos e idiopáticos. Para os casos triados para HAC pelo programa Nacional de Triagem neonatal de Alagoas, será realizada a investigação de mutações frequentes no gene CYP21A2, através da PCR Alelo Específico. Essa etapa será realizada no SGC/HUPAA/UFAL. Para os casos de HAC que não apresentarem alterações pela PCR, será realizado o sequenciamento completo e MLPA do gene CYP21A2. Uma das metas desse projeto é a implementação do sequenciamento do CYP21A2 no SGC/UFAL. Como trata-se de uma técnica complexa, a equipe executora do CBMEG/UNICAMP, que apresenta vasto conhecimento nesse tipo de exame, auxiliará nos ensaios e realizará a contraprova dos resultados. A coleta de dados clínicos e familiares serão obtidos da partir dos seguintes instrumentos: protocolo utilizado no ambulatório de genética do HUPAA, testado e aplicado em estudo anterior (Gazzaneo, et. al, 2015). Para os casos idiopáticos, será realizado o sequenciamento do exoma, uma técnica robusta que identifica alteração em todos o genes do genoma humano. Essa técnica está sendo usado para casos idiopáticos e tem facilitado a elucidação etiológica

dos casos de DDS. Essa etapa será realizada em laboratórios particulares e a validação dos dados será realizada no CBMEG/UNICAMP e SGC/HUPAA/UFAL. Visando ampliar e compartilhar o conhecimento acerca da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS, será realizada oficina sobre DDS nos programas de residência em pediatria de Alagoas e para psicólogos dos núcleos de atenção à saúde da família da capital e interior de Alagoas. Na última etapa da metodologia, a equipe se dedicará à produção do relatório através da organização das discussões dos resultados provenientes dos diferentes métodos utilizados. Critério de Inclusão: Pessoas com suspeita de Distúrbio da Diferenciação do Sexo, em qualquer idade, com ou sem anormalidades genitais, oriundos do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da UFAL e do Programa Nacional de Triagem Neonatal de Alagoas. Critério de Exclusão: Serão excluídos natimortos e casos de malformações múltiplas. Objetivo Primário: Ampliar e descentralizar a atenção à saúde dos casos de distúrbio da diferenciação do sexo atendidos no SUS em Alagoas. Objetivo Secundário: 1 – Descrever as características clínicas e etiológicas dos casos de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) atendidos no SUS em Alagoas, com informações adquiridas durante o atendimento por equipe multidisciplinar e resultados dos exames complementares para a elucidação etiológica. 2 - Atualizar o banco de dados sobre Distúrbio da Diferenciação do Sexo em Alagoas, com informações colhidas durante o atendimento e estudo de cada caso, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares. 3 - Compôr um banco de dados único para os casos de HAC de Alagoas. Considerando que o PNTN e o serviço de genética clínica do HUPAA reúnem todos os casos de HAC atendidos pelo SUS em Alagoas, será criado um banco de dados único, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares de cada caso. Isso facilitará o entendimento sobre suas particularidades, além de facilitar o planejamento de ações, no âmbito do SUS, para esses casos. 4 – Descrever os efeitos das reuniões do grupo de DDS no atendimento dos casos por equipe multidisciplinar, através de reuniões clínicas, com periodicidade mensal, com os integrantes do grupo multidisciplinar de DDS/HUPAA/UFAL. A partir do registro escrito das reuniões, será realizada análise qualitativa das reuniões multidisciplinares, considerando: as demandas endereçadas ao ambulatório de DDS; a discussão de casos clínicos e a direção do tratamento; os impasses na atenção integrada em saúde. 5 - Descentralizar ações de saúde para os casos de DDS de Alagoas, através do intercâmbio de experiência entre o grupo multidisciplinar de DDS do HUPAA com profissionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) de Alagoas e Núcleo

de Apoio à Saúde da Família (NASF) da capital e interior do estado. Para atingir esse objetivo, será realizado curso de capacitação para os profissionais de saúde do PNTN e NASF. 6 - Reunir informações para subsidiar o planejamento da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS em Alagoas, através das informações descritas nos objetivos anteriores e das reuniões multidisciplinares.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Ampliar e descentralizar a atenção à saúde dos casos de distúrbio da diferenciação do sexo atendidos no SUS em Alagoas. Objetivo Secundário: 1 – Descrever as características clínicas e etiológicas dos casos de Distúrbio da Diferenciação do Sexo (DDS) atendidos no SUS em Alagoas, com informações adquiridas durante o atendimento por equipe multidisciplinar e resultados dos exames complementares para a elucidação etiológica. 2 - Atualizar o banco de dados sobre Distúrbio da Diferenciação do Sexo em Alagoas, com informações colhidas durante o atendimento e estudo de cada caso, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares. 3 - Compor um banco de dados único para os casos de HAC de Alagoas. Considerando que o PNTN e o serviço de genética clínica do HUPAA reúnem todos os casos de HAC atendidos pelo SUS em Alagoas, será criado um banco de dados único, com informações sociodemográficas, clínicas, citogenéticas e moleculares de cada caso. Isso facilitará o entendimento sobre suas particularidades, além de facilitar o planejamento de ações, no âmbito do SUS, para esses casos. 4 – Descrever os efeitos das reuniões do grupo de DDS no atendimento dos casos por equipe multidisciplinar, através de reuniões clínicas, com periodicidade mensal, com os integrantes do grupo multidisciplinar de DDS/HUPAA/UFAL. A partir do registro escrito das reuniões, será realizada análise qualitativa das reuniões multidisciplinares, considerando: as demandas endereçadas ao ambulatório de DDS; a discussão de casos clínicos e a direção do tratamento; os impasses na atenção integrada em saúde. 5 - Descentralizar ações de saúde para os casos de DDS de Alagoas, através do intercâmbio de experiência entre o grupo multidisciplinar de DDS do HUPAA com profissionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) de Alagoas e Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) da capital e interior do estado. Para atingir esse objetivo, será realizado curso de capacitação para os profissionais de saúde do PNTN e NASF. 6 - Reunir informações para subsidiar o planejamento da atenção à saúde de pessoas com DDS no SUS em Alagoas, através das informações descritas nos objetivos anteriores e das reuniões multidisciplinares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: As amostras de sangue periférico serão obtidas por punção venosa, com risco muito baixo. O risco da coleta de sangue pode incluir hiperemia local transitória, hematoma, celulite ou flebite. O desconforto será mínimo, pois a coleta será realizada por profissional treinado ou pelo responsável pelo projeto, devidamente habilitados para este procedimento. Medidas de proteção: assepsia e antissepsia do local para a coleta de amostra de sangue e utilização de materiais descartáveis. A Ultrassonografia não apresenta risco ao paciente, exceto às crianças que necessitem de sedação para realização do exame. Contudo, a sedação é de baixo risco e realizada na presença de médico e de equipamento de segurança necessários. Benefícios: Como benefícios, podemos elencar: aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento de pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde. Benefícios: Como benefícios, podemos elencar: aumento nas produções científicas pertinentes ao tema, possibilitando maiores discussões e o aperfeiçoamento do atendimento de pessoas com DDS e seus familiares bem como ampliação do conhecimento atual sobre esses distúrbios em vista do planejamento de políticas públicas de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo se encontra de acordo com a Resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem óbice ético.

Recomendações:

.

PENDÊNCIAS NO PROJETO

- Recrutamento do participante e aquisição do TCLE - Solicita-se que o termo "paciente/sujeito/voluntário" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa" ao longo do texto, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS n. 466 de 2012 e art. 2º, XIII da Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Resolução CNS n. 510 de 2016: descrever essa etapa; - Razões para utilização de grupos vulneráveis: descrever - PENDÊNCIA ATENDIDA - CRITÉRIOS PARA SUSPENDER A PESQUISA incluir PENDÊNCIA ATENDIDA PENDÊNCIA DOCUMENTAL - Autorizações: arquivo de Autorização da pesquisa não está abrindo. Reanexá-lo - PENDÊNCIA ATENDIDA - INSTRUMENTO DA PESQUISA: incluir, com a opção "Não desejo responder" no Instrumento de coleta de dados - PENDÊNCIA ATENDIDA

IMPORTANTE: TODOS OS ARQUIVOS ANEXADOS A PLATAFORMA devem permitir o uso dos recursos “copiar” e “colar” em qualquer palavra ou trecho do texto (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, anexo II - PENDÊNCIA ATENDIDA – lista de checagem para protocolos de pesquisa). PENDÊNCIA ATENDIDA - Arquivos dos pesquisadores e instituições participantes e coparticipantes estão violados. Reanexá- los - PENDÊNCIA ATENDIDA PENDÊNCIAS NO TCLE - O arquivo anexado a plataforma permite recurso “COPIAR” e “COLAR” - O arquivo deve permitir o uso dos recursos “copiar” e “colar” em qualquer palavra ou trecho do texto (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, anexo II – lista de checagem para protocolos de pesquisa): - Rever, pois o arquivo do TCLE não permite a opção copiar e colar - PENDÊNCIA ATENDIDA - Nomenclatura relativa ao participante da pesquisa - Solicita-se que o termo "paciente/sujeito/voluntário" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa" ao longo do texto do TCLE, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012: rever em seu texto. PENDÊNCIA ATENDIDA - Numeração de página – Todas as páginas devem ser enumeradas, com a quantidade total delas, como, por exemplo: "1 de 3" e assim sucessivamente, até a página "3 de 3": rever em seu texto - Linguagem acessível: rever linguagem para que haja compreensão dos participantes da pesquisa - PENDÊNCIA ATENDIDA - Período do estudo: -Rever o início da coleta de dados, considerando Maio/2020 para o início das atividades do PPSUS - PENDÊNCIA ATENDIDA - Justificativa, objetivos e procedimentos - Quanto aos procedimentos, descrever no TCLE os procedimentos a serem realizados na pesquisa, pontuando quais análises serão realizadas e o objetivo de cada análise(Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a). Quanto ao esclarecimento do participante, os procedimentos adotados no estudo devem ser explicitados de forma menos sintética no TCLE, informando-se, por exemplo, o local e o momento em que ocorrerão as entrevistas/questionário/grupo focal, bem como seu tempo de duração e os tópicos a serem abordados: incluir. PENDÊNCIA ATENDIDA - Deixar mais claro todas etapas e procedimentos a serem realizados com os participantes da pesquisa, pois no item “que eu participarei da seguinte forma: entrevista” não explicita todos os procedimentos a serem realizados; PENDÊNCIA ATENDIDA - Rever os incômodos no TCLE – PACIENTES – pois se refere ao TCLE de responsáveis (vide trecho– “... um possível desconforto por envolver aspectos da sexualidade do meu filho(a)...” e não está de acordo com o texto descrito no projeto de pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA - Incluir uma breve descrição do que é o CEP e qual a sua função - O TCLE deve conter uma breve descrição do que é o CEP e qual a sua função -

PENDÊNCIA ATENDIDA - Garantia que o documento será emitido em duas vias - Solicita-se que conste neste documento informação de que o TCLE é elaborado em duas VIAS (e não "CÓPIA"), que deverão ser assinadas ao final pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pelas pessoas por ele delegadas (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d): incluir - PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Ilmo. Prof. Reginaldo José Petrolí, lembre-se que, segundo a Res. CNS 466/12: O Participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber cópia do TCLE, na íntegra, por ele assinado, a não ser em estudo com autorização de declínio; V.S^a. deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade por este CEP, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata; O CEP deve ser imediatamente informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É responsabilidade do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas a evento adverso ocorrido e enviar notificação a este CEP e, em casos pertinentes, à ANVISA; Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial;

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

MACEIO, 18 de Março de 2021

CAMILA MARIA BEDER RIBEIRO GIRISH PANJWANI

ANEXO B – Normas para envio de manuscrito – Jornal de Pediatria

JORNAL DE PEDIATRIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Pediatria

GUIA PARA AUTORES

DESCRIÇÃO

Publicação bimensal da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), em circulação desde 1934. O Jornal de Pediatria publica artigos originais e artigos de revisão, abrangendo as diversas áreas da pediatria. Através da publicação e divulgação de relevantes contribuições científicas da comunidade médico-científica nacional e internacional da área de pediatria, o Jornal de Pediatria busca elevar o padrão da prática pediátrica e do atendimento médico especializado em crianças e adolescentes.

FATOR DE IMPACTO

2018: 1,689 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

FONTES DE INDEXAÇÃO

MEDLINE®

LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

Index Medicus

EMBASE

SciELO - Scientific Electronic Library Online

University Microfilms International

Excerpta Medica

Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases

Science Citation Index Expanded

Journal Citation Reports - Science Edition

COMITÊ EDITORIAL

Editor-chefe Renato Soibelman Procianoy, Professor titular, Departamento de Pediatria e Cuidados Infantis, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

EDITORES ASSOCIADOS

Antonio José Ledo da Cunha – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Crésio de Aragão Dantas Alves – Professor Associado, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

Dirceu Solé – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Gisélia Alves Pontes da Silva – Professora Titular, Departamento de Gastroenterologia Pediátrica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

João Guilherme Bezerra Alves – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brasil

Magda Lahorgue Nunes – Professora Associada, Departamento de Pediatria e Medicina Interna/Neurologia, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Marco Aurélio Palazzi Sáfy – Professor Associado, Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil

Paulo Augusto Moreira Camargos – Professor Titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Conselho Editorial

- Eduardo Bancalari - Miami, EUA
- Marco A. Barbieri - Ribeirão Preto, Brasil
- Fernando C. Barros - Montevideu, Uruguai
- Andrea Biondi - Monza, Itália
- Andrew Bush - Londres, Inglaterra
- Jaderson C. da Costa - Porto Alegre, Brasil
- Richard N. Fine - Nova Iorque, EUA
- Ruth Guinsburg - São Paulo, Brasil
- Alan H. Jobe - Cincinnati, EUA
- Jacques Lacroix - Montreal, Canadá
- Francisco E. Martinez - Ribeirão Preto, Brasil
- Jean-Christophe Mercier - Paris, França
- Marisa M. Mussi-Pinhata - Ribeirão Preto, Brasil
- Francisco J. Penna - Belo Horizonte, Brasil

- Richard A. Polin - Nova Iorque, EUA
- Nelson A. Rosário - Curitiba, Brasil
- Adrian Sandler - Asheville, EUA
- Clemax C. Sant'Anna - Rio de Janeiro, Brasil
- Shlomo Shinnar - Nova Iorque, EUA
- Themis R. da Silveira - Porto Alegre, Brasil
- Augusto Sola - Morristown, EUA
- Robert C. Tasker - Cambridge, Inglaterra
- Ann E. Thompson - Pittsburgh, EUA
- T. Michael O'Shea - Winston-Salem, USA
- Luiz G. Tone - Ribeirão Preto, Brasil
- Yvan Vandenplas - Bruxelas, Bélgica
- John O. Warner - Londres, Inglaterra

Tipos de Artigo

O Jornal de Pediatria aceita submissões de artigos originais, artigos de revisão e cartas ao editor. Artigos originais incluem relatos de estudos controlados e randomizados, estudos de triagem e diagnóstico e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como registros sobre pesquisas básicas realizadas com animais de laboratório (ver seção Resultados dos ensaios clínicos mais adiante). Os manuscritos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e anexos), 30 referências e quatro tabelas e figuras. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Artigos de revisão incluem meta-análises, avaliações sistemáticas e críticas da literatura sobre temas de relevância clínica, com ênfase em aspectos como causa e prevenção de doenças, diagnóstico, tratamento e prognóstico. Os artigos de revisão não devem exceder 6.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e tabelas) e devem citar no mínimo 30 referências atualizadas. Normalmente, profissionais de reconhecida experiência são convidados a escrever artigos de revisão. As metanálises estão incluídas nesta categoria. O Jornal de Pediatria também considera artigos de revisão não solicitados. Entre em contato pelo e-mail assessoria@jped.com.br para submeter um esboço ou roteiro ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito completo. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo. Cartas ao editor costumam expressar uma

opinião, discutir ou criticar artigos publicados anteriormente no Jornal de Pediatria. As cartas não devem exceder 1.000 palavras e seis referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores do artigo ao qual a carta se refere será publicada junto com a carta. Editoriais e comentários, que normalmente fazem referência a artigos selecionados, são solicitados a especialistas na área. O Conselho Editorial pode considerar a publicação de comentários não solicitados, desde que os autores apresentem um esboço ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito.

Idioma

A partir de 9 de dezembro de 2019, os trabalhos devem ser enviados em inglês, pois serão publicados apenas em inglês (html e pdf). A grama adotada é a do inglês americano.

Estrutura do Artigo

Subdivisão – Seções não numeradas

O texto principal nos artigos originais deve conter as seguintes seções, indicadas por uma legenda:

Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. As seções nos artigos de revisão podem variar dependendo do tópico tratado. Sugerimos que os autores incluam uma breve introdução, na qual eles expliquem (da perspectiva da literatura médica) a importância daquela revisão para a prática da pediatria. Não é necessário descrever como os dados foram selecionados e coletados. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão para possíveis aplicações clínicas, mantendo generalizações dentro do escopo do assunto sob revisão.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um background adequado, evitando uma avaliação detalhada da literatura ou um resumo dos resultados. Faça uma introdução breve, incluindo apenas referências estritamente relevantes para sublinhar a importância do tópico e para justificar o estudo. No fim da introdução, os objetivos do estudo devem estar claramente definidos.

Materiais e Métodos

Forneça detalhes suficientes para viabilizar a reprodução do trabalho. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas as modificações relevantes devem ser descritas. Esta seção deve descrever a população estudada, a amostra a ser analisada e os critérios de seleção; também deve definir claramente as variáveis em estudo

e descrever detalhadamente os métodos estatísticos empregados (incluindo referências apropriadas sobre métodos estatísticos e software). Procedimentos, produtos e equipamentos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. Deve ser incluída uma declaração relativa à aprovação pelo comitê de ética de pesquisa (ou equivalente) da instituição em que o trabalho foi realizado.

Resultados

Os resultados do estudo devem ser apresentados de forma clara e objetiva, seguindo uma sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Use figuras no lugar de tabelas para apresentar dados extensos.

Discussão

Os resultados devem ser interpretados e comparados com dados publicados anteriormente, destacando os aspectos novos e importantes do presente estudo. Devem-se discutir as implicações dos resultados e as limitações do estudo, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas ao fim da seção Discussão, levando em consideração a finalidade do trabalho. Relacione as conclusões com os objetivos iniciais do estudo, evitando declarações não embasadas pelos achados e dando a mesma ênfase aos achados positivos e negativos que tenham importância científica similar. Se relevante, inclua recomendações para novas pesquisas.

Informações essenciais sobre a página de abertura

A página de abertura deve conter as seguintes informações: a) título conciso e informativo. Evite termos e abreviaturas desnecessários; evite também referências ao local e/ou cidade onde o trabalho foi realizado; b) título curto com não mais de 50 caracteres, incluindo espaços, mostrado nos cabeçalhos;

c) nomes dos autores (primeiro e último nome e iniciais do meio) e o ORCID ID. O ORCID ID deve estar na página de abertura e, também, no perfil do EVISE de todos os autores. Para isso, o autor deve ir em Update your Details, campo ORCID. Se algum dos autores não tem esta ID, deve registrar-se em <https://orcid.org/register>; d) grau acadêmico mais elevado dos autores; e) endereço de e-mail de todos os autores; f) se disponível, URL para o curriculum vitae eletrônico (“Currículo Lattes” para autores brasileiros, ORCID etc.) g) contribuição específica de cada autor para o estudo; h) declaração de conflitos de interesse (escreva nada a declarar ou divulgue explicitamente quaisquer interesses financeiros ou outros que possam causar constrangimento caso sejam revelados após a publicação do artigo); i) instituição ou serviço com o/a qual o trabalho está

associado para indexação no Index Medicus/MEDLINE; j) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor para correspondência; k) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor encarregado do contato pré-publicação; l) fontes de financiamento, ou nome de instituições ou empresas fornecedoras de equipamentos e materiais, se aplicável; m) contagem de palavras do texto principal, sem incluir resumo, agradecimentos, referências, tabelas e legendas para figuras; n) contagem de palavras do resumo; o) número de tabelas e figuras.

Resumo

É necessário um resumo conciso e factual. O resumo deve indicar de forma breve o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as conclusões mais importantes. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ser compreendido sozinho. Por esse motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o(s) autor(es) e ano(s). Além disso, abreviações não padrão ou incomuns devem ser evitadas, mas, se forem essenciais, devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo. O resumo não deve ter mais de 250 palavras ou 1.400 caracteres. Não inclua palavras que possam identificar a instituição ou cidade onde o estudo foi realizado, para facilitar a revisão cega. Todas as informações no resumo devem refletir com precisão o conteúdo do artigo. O resumo deve ser estruturado conforme descrito a seguir:

Resumo para artigos originais

Objetivo: Declarar porque o estudo foi iniciado e as hipóteses iniciais. Defina com precisão o objetivo principal do estudo; apenas os objetivos secundários mais relevantes devem ser listados. **Método:** Descrever o desenho do estudo (se apropriado, indique se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), local (se apropriado, descreva o nível de atendimento, isto é, se primário, secundário ou terciário, clínica privada ou instituição pública, etc.), pacientes ou participantes (critérios de seleção, número de casos no início e no final do estudo etc.), intervenções (incluem informações essenciais, como métodos e duração do estudo) e critérios utilizados para medir os resultados. **Resultados:** Descrever os achados mais importantes, os intervalos de confiança e a significância estatística dos achados. **Conclusões:** Descrever apenas conclusões que refletem o objetivo do estudo e fundamentadas por suas descobertas. Discutir possíveis aplicações das descobertas, com igual ênfase em resultados positivos e negativos de mérito científico similar.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, utilizando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e múltiplos conceitos (evite, por exemplo, ‘e’, ‘de’). Use poucas abreviações: apenas aquelas firmemente estabelecidas no campo de pesquisa podem ser escolhidas. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação. Por favor, utilize os termos listados no Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Quando descritores adequados não estiverem disponíveis, novos termos podem ser utilizados. Abreviações
Seja moderado no uso de abreviações. Todas as abreviações devem ser explicadas em sua primeira menção no texto. As abreviações não padrão no campo da pediatria devem ser definidas em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Evite o uso de abreviações no resumo; aquelas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas em sua primeira menção, bem como na nota de rodapé. Assegure-se da consistência das abreviações em todo o artigo.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada ao fim do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de abertura, como uma nota de rodapé para o título ou de outra forma. Liste aqui os indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda linguística, assistência escrita ou prova de leitura do artigo, etc.). Somente indivíduos ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas não são qualificados para autoria, devem ser mencionados. Os indivíduos citados nesta seção devem concordar por escrito com a inclusão de seus nomes, uma vez que os leitores podem inferir o endosso das conclusões do estudo.

Formatando as fontes de financiamento

Listar as fontes de financiamento usando a forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Esse trabalho recebeu financiamento do National Institutes of Health [números dos financiamentos xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [número do financiamento zzzz]; e dos United States Institutes of Peace [número do financiamento aaaa]. Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de financiamento e prêmios. Quando a verba recebida é parte de um financiamento

maior ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, cite o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhum financiamento específico de agências de financiamento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Unidades

Siga as regras e convenções internacionalmente aceitas: use o sistema internacional (SI) de unidades. Se outras unidades forem mencionadas, forneça seu equivalente em SI.

Fórmulas matemáticas

Por favor, cite equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use a barra oblíqua (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X/Y . Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Potências de e são frequentemente mais convenientemente indicadas pela exponencial. Numere consecutivamente quaisquer equações a serem exibidas separadamente do texto (se referidas explicitamente no texto).

Notas de rodapé

Notas de rodapé não devem ser usadas. Em vez disso, incorpore as informações relevantes no texto principal.

Imagens

Manipulação de imagem

Embora seja aceito que os autores às vezes precisem manipular imagens para obter maior clareza, a manipulação para fins de dolo ou fraude será vista como abuso ético científico e será tratada de acordo. Para imagens gráficas, esta revista aplica a seguinte política: nenhum recurso específico pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido em uma imagem. Os ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cores são aceitáveis se, e enquanto não obscurecerem ou eliminarem qualquer informação presente no original. Os ajustes não lineares (por exemplo, alterações nas configurações de gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

Imagens eletrônicas

Pontos Gerais

- Certifique-se de usar letras uniformes e dimensionamento de suas imagens originais.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Prefira usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes similares.
- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma convenção de nomeação lógica para seus arquivos de imagens.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Um guia detalhado sobre imagens eletrônicas está disponível. Você é convidado a visitar este site; alguns trechos das informações detalhadas são fornecidos aqui.

Formatos

Se as suas imagens eletrônicas forem criadas em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça “como está” no formato de documento original. Independentemente do aplicativo utilizado que não seja o Microsoft Office, quando sua imagem eletrônica for finalizada, utilize “Salvar como” ou converta as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos em linha contínua, meio-tom e combinações de desenho/meio-tom descritos a seguir). EPS (ou PDF): Desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes utilizadas. TIFF (ou JPEG): Fotografias em cores ou em tons de cinza (meios-tons), mantenha um mínimo de 300 dpi. TIFF (ou JPEG): Desenho de linha de bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha um mínimo de 1000 dpi. TIFF (ou JPEG): Combinações de linha de bitmap/meio-tom (colorido ou escala de cinza), mantenha um mínimo de 500 dpi.

Por favor não:

- Forneça arquivos otimizados para o uso da tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); esses formatos tipicamente têm um baixo número de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Imagens Coloridas

Por favor certifique-se de que os arquivos de imagens estão em um formato aceitável (TIFF [ou JPEG], EPS [ou PDF] ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o seu artigo aceito, você enviar figuras de cor utilizáveis, a Elsevier

assegurará, sem custo adicional, que essas figuras aparecerão em cores (por exemplo, ScienceDirect e outros sites).

Serviços de ilustração

O Elsevier's WebShop oferece serviços de ilustração aos autores que estão se preparando para enviar um manuscrito, mas estão preocupados com a qualidade das imagens que acompanham o artigo. Os experientes ilustradores da Elsevier podem produzir imagens científicas, técnicas e de estilo médico, bem como uma gama completa de quadros, tabelas e gráficos. O “polimento” da imagem também está disponível; nossos ilustradores trabalham suas imagens e as aprimoram para um padrão profissional. Visite o site para saber mais a respeito disso.

Legendas de figuras

Certifique-se de que cada figura tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas às figuras. Uma legenda deve incluir um breve título (não na figura em si) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto curto nas ilustrações propriamente ditas, mas explique todos os símbolos e abreviações utilizados.

Tabelas

Por favor, envie as tabelas como texto editável e não como imagem. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no fim. Numere as tabelas de forma consecutiva de acordo com sua ordem no texto e coloque as notas de tabela abaixo do corpo da mesma. Seja moderado no uso das tabelas, e assegure-se de que os dados apresentados nas mesmas não duplicam os resultados descritos em outro lugar no artigo. Evite usar grades verticais e sombreamento nas células da tabela.

Referências

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Qualquer referência citada no resumo deve ser fornecida na íntegra. Não recomendamos o uso de resultados não publicados e comunicações pessoais na lista de referências, mas eles podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e devem incluir uma substituição da data de publicação por “Resultados não publicados” ou “Comunicação pessoal”. A citação de uma referência como in press implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência

Maior exposição da pesquisa e revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line às fontes citadas. Para permitir-nos criar links para serviços de resumos e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estão corretos. Lembre-se que sobrenomes, títulos de revistas/livros, ano de publicação e paginação incorretos podem impedir a criação de links. Ao copiar referências, por favor tenha cuidado, porque as mesmas já podem conter erros. O uso do DOI — identificador de objeto digital (Digital Object Identifier) é encorajado.

Um DOI pode ser usado para citar e criar um link para artigos eletrônicos em que um artigo está in-press e detalhes de citação completa ainda não são conhecidos, mas o artigo está disponível on-line. O DOI nunca muda, então você pode usá-lo como um link permanente para qualquer artigo eletrônico.

Um exemplo de uma citação usando um DOI para um artigo que ainda não foi publicado é: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeg W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Por favor, observe que o formato dessas citações deve seguir o mesmo estilo das demais referências no manuscrito.

Referências da Web

A URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação-fonte etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referência.

Referências de dados

Esta revista sugere que você cite conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome(s) do(s) autor(es), título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente. Adicione [conjunto de dados] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-la corretamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá no seu artigo publicado.

Os usuários do Mendeley Desktop podem facilmente instalar o estilo de referência para esta revista clicando no seguinte link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/jornal-de-pediatria>

Ao preparar seu manuscrito, você poderá selecionar esse estilo utilizando os plug-ins do Mendeley para o Microsoft Word ou o LibreOffice.

Estilo de Referências

As referências devem seguir o estilo Vancouver, também conhecido como o estilo de Requisitos Uniformes, fundamentado, em grande parte, em um estilo do American National Standards Institute, adaptado pela National Library of Medicine dos EUA (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar o Citing Medicine, o Guia de estilo da NLM para autores, editores e editoras, para obter informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referência. Os autores também podem consultar exemplos de referências (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), em uma lista de exemplos extraídos ou baseados no Citing Medicine para fácil uso geral; esses exemplos de referências são mantidos pela NLM. As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto entre colchetes. Não use numeração automática, notas de rodapé ou de pé de página para referências. Artigos não publicados aceitos para publicação podem ser incluídos como referências se o nome da revista estiver incluído, seguido de “in press”. Observações e comunicações pessoais não publicadas não devem ser citadas como referências; se for essencial para a compreensão do artigo, essa informação pode ser citada no texto, seguida pelas observações entre parênteses, observação não publicada ou comunicação pessoal. Para mais informações, consulte os “Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas”, disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>.