

ADÃO CARLOS BERTONCIN

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno **Adão Carlos Bertoncin**

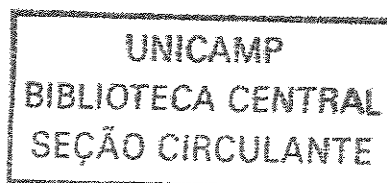
Campinas, 06 de agosto de 2002.


Prof.ª Dra. Fátima Aparecida Bottcher Luiz
Orientadora

**DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO PRÉ-NATAL EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
-CONTRIBUIÇÃO AO PROGRAMA DE MEDICINA FETAL-**

CAMPINAS

2002



ADÃO CARLOS BERTONCIN

***DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO PRÉ-NATAL EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
-CONTRIBUIÇÃO AO PROGRAMA DE MEDICINA FETAL-***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. FÁTIMA BÖTTCHER LUIZ

CAMPINAS

2002

Nº CHAMADA T/UNICAMP	
B462d	
V	EX
TOMBO BC/ 51852	
PROC. 16. 887-02	
C ☐	D ☒
PREÇO 25 11,00	
DATA 16/12/02	
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM0017740B-3

B ID 276256

B462d Bertoncin, Adão Carlos
Diagnóstico citogenético pré-natal em um hospital universitário –
Contribuição ao programa de medicina fetal / Adão Carlos Bertoncin.
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Fátima Aparecida Böttcher Luiz
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citogenética. 2. Líquido amniótico. 3. Amniocentese. I.
Fátima Aparecida Böttcher Luiz. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fátima Aparecida B. Luiz

Membros:

1. Profa. Dra. Rosa Chelminsky Teixeira

2. Prof. Dr. Luís Alberto Magna

3. Profa. Dra. Fátima Ap. B. Luiz

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

Data: 06/08/2002

1538557

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Maria Vilma e Laherte, seres absolutamente especiais que sempre pisaram firme para que eu pudesse seguir seus passos, recebendo em todo o tempo apoio e dedicação.

Às minhas filhas Ana Caroline e Julia Taíse, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos, principalmente naqueles em que o trabalho me fez ausente. E também à minha esposa Dulce.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dra. Fátima Böttcher Luiz, pelo apoio e orientação.

Prof. Dra. Rosa Chelminsky Teixeira, pelo apoio e, sobretudo, pelo ensinamento, de que o conhecimento, aliado à dedicação, são as maiores virtudes de um profissional.

Prof. Dr. Ricardo Barini, pela contribuição na elaboração dos resultados do trabalho.

Prof. Dra. Denise Cavalcanti, pelo apoio e esclarecimentos de dúvidas.

Prof. Carlos Roberto E. Grignolli, pelo apoio e incentivo.

Prof. Dr. Marcelo A. M. Esquisatto, pela amizade e apoio.

Ao Edson Zangiacomi Martinez, pela realização da análise estatística.

Aos colegas do Departamento de Genética Médica (Henry, Nilma, Toninho, Paulinho e Jocimar), pelos momentos de descontração e pelos primeiros ensinamentos em citogenética.

À grande amiga Tânia Regina Carillo, que com paciência inabalável, que me ensinou a reconhecer as primeiras bandas cromossômicas e também pelo constante incentivo e comprovada amizade.

Aos amigos do Laboratório de Procedimentos Especializados (LAPESP), Sandra, Eloy, Francis, Ju; Carol, Rosana, Aldrey, Adriana, Ziara, Luciana, Daniela e Alex, pelo auxílio, apoio, pelo ombro amigo, pela descontração de cada dia.

Agradeço a todos os professores que colaboraram para a minha formação.

À Prefeitura Municipal de Araras e Secretaria da Saúde, cujo incentivo possibilitou meu aperfeiçoamento na área de citogenética.

À Dr^a. Cecy de Souza Lima Mion, Secretária da Saúde do Município de Araras pelo apoio decisivo.

Ao Centro Universitário Hermínio Ometto, pela disponibilidade de horário para realização deste trabalho.

Aos amigos Marcus Cabral e Valdenilson J. Zorel, pelas dicas e ajuda na informática.

Às gestantes, pela autorização da coleta de material e pela colaboração constante.

“Que me seja dada a serenidade de aceitar as coisas que eu não posso mudar, a coragem de mudá-las quando eu puder e a sabedoria de conhecer a diferença entre as duas situações.”

(autor desconhecido)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular, Departamento de Tocoginecologia/CAISM e Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	28
CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
Amostra.....	31
Encaminhamentos.....	31
Coleta de sangue do cordão umbilical.....	34
Coleta de líquido amniótico.....	34
Recebimentos de amostras.....	35
Técnica convencional de cultura primária de líquido amniótico.....	35
Técnica de cultura primária de líquido amniótico e cariótipo <i>in situ</i>	35
Análise citogenética.....	36
Coleta de dados e análise estatística.....	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	Alfa-fetoproteína
CAISM	Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher
DFTN	Defeito de fechamento de tubo neural
FISH	Fluorescence in situ hybridization (hibridação <i>in situ</i> por fluorescência)
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PMF	Programa de Medicina Fetal
PNE	Pré-Natal Especializado
RCIU	Restrição de crescimento intra uterino
RP	Razão de prevalência
SNC	Sistema Nervoso Central
uE3	Estriol não conjugado

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Anomalias morfológicas fetais detectadas no exame ultra-sonográfico e alterações citogenéticas associadas.....	20
Tabela 2: Distribuição da amostra de gestantes no grupo sob estudo segundo a faixa etária, quando admitidas no serviço.....	39
Tabela 3: Distribuição da amostra de gestantes do grupo sob estudo segundo a idade gestacional, quando admitidas no serviço.....	40
Tabela 4: Distribuição do grupo de estudo segundo o número de gestações..	41
Tabela 5: Distribuição do grupo de estudo segundo o número de abortos.....	41
Tabela 6: Distribuição da amostra segundo o ano de entrada dos exames no laboratório, falhas na obtenção de cariótipo e percentuais de alterações cromossômicas.....	42
Tabela 7: Indicação de cariótipo e alterações cromossômicas encontradas no grupo de estudo.....	45
Tabela 8: Alterações citogenéticas encontradas no grupo de estudo.....	46
Tabela 9: Comparação entre o grupo controle e o grupo de estudo.....	47
Tabela 10: Razão de prevalência das alterações cromossômicas por faixa etária, idade gestacional, gestações e número de abortos, calculadas para o grupo de estudo.....	48

	PÁG.
Figura 1: Período para realização da coleta invasiva pré-natal.....	21
Figura 2: Esquema do sistema de atendimento no Programa de Medicina Fetal.....	33
Figura 3: Distribuição do grupo de estudo segundo a faixa etária das gestantes.....	39
Figura 4: Distribuição da amostra de gestantes segundo a idade gestacional....	40
Figura 5: Solicitação de cariótipo e falhas ocorridas no período de 1993 a 2001.....	43
Figura 6: Solicitações e alterações cromossômicas ocorridas no período de 1993 a 2001.....	43



RESUMO

Objetivos: Investigar a participação do Laboratório de Citogenética na avaliação do diagnóstico pré-natal em um Hospital Universitário em Campinas, São Paulo, Brasil.

Casuística e métodos: Foi realizado um estudo retrospectivo com todos resultados de cariótipo do laboratório, referentes ao período de abril de 1993 a novembro de 2001.

Resultados: 673 resultados foram obtidos. 146 foram designados como controle (baixo risco para anomalias cromossômicas) e 527 foram designados como grupo de estudo. 84% dos diagnósticos foram realizados em pacientes com idade gestacional superior a 20 semanas. 546 (81%) cariótipos foram obtidos de sangue fetal através de cordocentese, e 127 (19%) a partir de cultura de líquido amniótico. Do total de cariótipos anormais, 53% foram encontrados em pacientes acima de 35 anos de idade. Anomalias do sistema nervoso central (SNC) constituíram 41% de todas as indicações para realização de cariótipo, especialmente hidrocefalia e defeitos de tubo neural. Outras indicações foram: idade materna acima de 40 anos e malformações múltiplas (9%), história familiar de malformações congênitas (9%), defeitos de sistema urinário (8%), hidropsia fetal (7%) e outras múltiplas ocorrências (26%). Cariótipo alterado foi encontrado em mais de 20% dos casos de malformações do sistema nervoso central, cardiopatia estrutural, onfalocele, higroma cístico e restrição de crescimento fetal.

Conclusões: Os altos níveis de anomalias cromossômicas em gestantes acima de 35 anos confirmam a necessidade de aconselhamento pré-natal adequado. A análise de cariótipo pela cordocentese constitui uma estratégia segura e rápida para a instituição, uma vez que as pacientes são encaminhadas para um centro de medicina terciária em idade gestacional avançada.



ABSTRACT

OBJECTIVES: To investigate the participation of a Cytogenetics Laboratory in the assessment of the prenatal diagnosis in a Woman's university Hospital in Campinas, São Paulo, Brazil.

PATIENTS AND METHODS: A retrospective study was performed with all analyzed karyotype results in the laboratory, regarding material collected from april 1992 to November 2001.

RESULTS: 673 results were obtained. 146 were designated as controls (low risk for chromosomal anomalies) and 527 were designated as the study group. 84% of the patients were diagnosed with gestational age above 20 weeks. 542 (81%) karyotype were obtained from fetal blood by cordocentesis and 126 (19%) from amniotic fluid cell culture. Of all abnormal karyotypes, 53% were found in patients over 35 years of age. Central nervous system (CNS) abnormalities constituted 41% of all indications for karyotype examination, mainly hydrocephaly and neural tube defects. Other defects included: maternal age over 40 years old and multiple malformations (9%), familial history of congenital malformations (9%), urinary system defects (8%) and fetal hydrops (7%) and other multiple occurrences (26%). Altered karyotype were found in more than 20% cases of CNS malformations, structural cardiopathy, omphalocele, cystic higroma and fetal growth restriction.

CONCLUSIONS: higher levels of chromosomal abnormalities in pregnant womem over 35 year confirm the need for an adequate prenatal counseling. Karyotype analysis through cordocentesis constitutes a faster and cheaper strategy for the institution once patients tend to be referred to a fetal medicine tertiary center at latter gestational ages.



INTRODUÇÃO

Os registros dos primeiros eventos relacionados à reprodução humana datam de 1930, quando foi descrita a liberação do ovócito de um ovário e, mais tarde, em 1944, a fecundação deste pelo espermatozóide. Em 1950, foram relatadas as transformações do zigoto humano durante os primeiros seis dias de vida, e a seguir realizaram-se estudos acerca da composição dos anexos fetais (Bevis, 1952). Na década seguinte, Steele & Breg (1966) relataram o cariótipo fetal a partir do cultivo de amniócitos, promovendo uma revolução nas áreas de diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético e possibilitando o auxílio no reconhecimento precoce de alterações fetais e de medidas terapêuticas específicas.

Em razão do comprometimento e do prognóstico sombrio em parcela significativa dos indivíduos afetados, deflagrou-se a polêmica acerca do aborto terapêutico e suas implicações no sentido ético, moral e religioso, discussão que até o momento está longe de chegar a um consenso, uma vez que mobiliza diversos referenciais da sociedade e desfoca os objetos principais de atenção, que seriam o portador da anomalia congênita e seus familiares. Apesar das divergências, o diagnóstico pré-natal tem se consolidado no meio científico e na estruturação dos sistemas de saúde das nações industrializadas, em razão das implicações sociais e econômicas envolvidas.

Entre os nativos, 2 a 5% apresentam algum tipo de anomalia congênita que poderia ser identificada durante os primórdios da vida intra-uterina. Ampliando o período de detecção para o primeiro ano de vida, a porcentagem de afetados chega a 7% e os defeitos congênitos responsáveis por mais de 20% das mortes ocorridas durante este período (Karchmer, 1998).

À medida que os indicadores gerais de saúde infantil vão melhorando, em razão dos avanços tecnológicos e da extensão dos programas de saúde pública, as malformações congênitas respondem com aumentos relativos, superiores a 20%, nos índices de morbimortalidade (Belmonte, 1996). Estas, entretanto, não compartilham da mesma atenção destinada às causas infecciosas e nutricionais, as quais são consideradas prioridades máximas do sistema de saúde materno-infantil (Ministério de Saúde, 2001).

Estudos de morbidade na infância indicam que as enfermidades genéticas e os defeitos congênitos representam 10-25% das internações em estabelecimentos de assistência terciária, em alguns centros da América Latina. Estes valores são muito semelhantes nas diversas regiões do globo, independentemente do nível de desenvolvimento econômico-social e da estrutura étnica das populações (Penchaszadeh, 1993).

Na América Latina, a prática da genética médica e o diagnóstico pré-natal estão muito aquém da cobertura prestada pelo mundo industrializado. Com exceção de poucos países, como Cuba, onde o serviço de diagnóstico pré-natal é oferecido a toda a população, segundo critérios de risco específicos (Heredero, 1997; Gordon & Ferra, 1999), em outras nações os recursos disponíveis restringem-se aos setores privados que, embora cercados de alta tecnologia, especializam-se no atendimento à população de alto poder aquisitivo (Penchaszadeh, 1993; Penchaszadeh & Beiguelman, 1997).

Nos países industrializados, o diagnóstico pré-natal constitui prioridade dos sistemas de saúde pública, especialmente nas gestantes com idade superior a 35 anos. Na Dinamarca e Reino Unido, entre 70% e 50% das mulheres, respectivamente, são beneficiadas com a amniocentese, enquanto que na França esses índices chegam a 30% (Karchmer, 1998). Sabe-se, entretanto, que dois terços dos casos de síndrome de Down ocorrem em gestações de mulheres com idade inferior a 35 anos (Tóth et al., 1998) e que as aneuploidias dos cromossomos X e 18 apresentam, respectivamente, incidência maior em gestantes mais jovens e malformações fetais algumas vezes sutis, dificilmente detectadas pela ultrassonografia não especializada (Hook, 1981). Desta forma, a restrição do exame citogenético às situações prioritárias de alto risco não constitui atendimento adequado à gestante, no que se refere aos cuidados à parturiente, ao recém-nascido e à comunidade como um todo. Além das indicações clássicas citadas acima, constituem também fator de risco o histórico familiar de doença congênita e/ou cromossômica, o retardo de crescimento intra-uterino, algumas alterações isoladas, como espessamento da prega nugal e cisto de plexo coróide, além das alterações morfológicas dos anexos embrionários e as alterações no volume de líquido amniótico. Mais recentemente, um novo grupo tem-se agregado às indicações anteriores e compreende gestantes ou casais com alto nível de ansiedade, frente

à possibilidade de gerar uma criança com malformação congênita (Hsu, 1986; Barini et al, 2002).

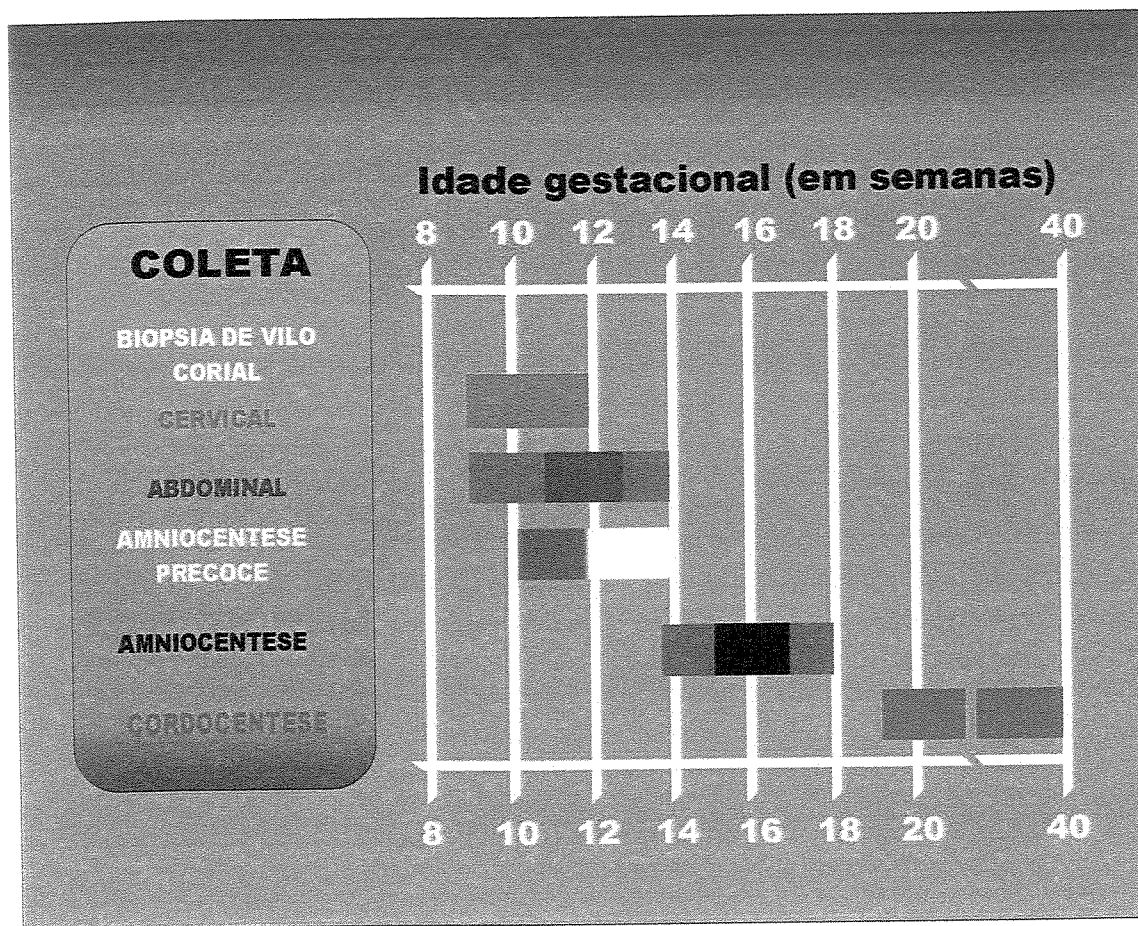
Os recentes avanços no campo de diagnóstico por imagens têm sido decisivos no auxílio ao diagnóstico precoce de anomalias fetais, quer pela alta qualidade de imagens no acompanhamento morfológico, quer pela facilitação e segurança dos procedimentos invasivos, diminuindo significativamente as chances de perdas fetais. Atualmente, a indicação destes procedimentos está fortemente condicionada aos recursos locais, compreendendo a equipe multidisciplinar especializada e a utilização de equipamentos compatíveis (Tabela 1).

Tabela 1: Anomalias morfológicas fetais detectadas no exame ultra-sonográfico e alterações citogenéticas associadas (*)

Anomalia	Alterações citogenéticas
Retardo de crescimento intra-uterino (RCIU)	Trissomias 18 e 21; triploidias Monossomias X e 5p-
Higroma cístico	Trissomias 13, 18 e 21 Monossomia X
Gastrosquise	Trissomia 13
Espessamento da pele da nuca	Trissomias 18 e 21; Monossomia X.
Cisto do plexo coróide	Trissomias 18 e 21; Monossomia X.
Aplasia radial	Trissomia 18
Poliidrâmnio	Trissomias 13, 18 e 21
Agenesia do corpo caloso	Trissomias 8, 13 e 18; Triploidias
Hidrocefalia	Trissomias 13 e 18; Triploidias
Hidropsia de origem não imunológica, edema, ascite.	Trissomia 21; Triploidias
Cardiopatias congênitas	Trissomias 8, 13, 18 e 21 Monossomia X; Triploidias Monossomias 4p-, 5p-, 13q-, 18q-
Holoprosencefalia	Trissomias 13 e 18; Triploidias, Monossomias 13q- e 18p-

(*) Modificado de Holzgreve et al. (1990) e Snijders et al. (1993).

Quando a análise citogenética é requerida como auxílio diagnóstico, uma das maiores dificuldades para obtenção de cariótipo é a necessidade de cultivo celular e interrupção do ciclo em metáfase, ocasião em que os cromossomos estão apresentados em estado de compactação adequado para tal. Como esta fase ocorre naturalmente em pequeno percentual da população celular viável, torna-se necessário aumentar as chances de ocorrência de células na fase requerida, motivo pelo qual o cultivo celular é tão importante nestas situações. Em qualquer uma delas, a obtenção de cariótipo está associada ao período gestacional e à conseqüente técnica laboratorial empregada. Assim, dependendo do período gestacional e dos recursos disponíveis, é possível direcionar a coleta ideal de material biológico, representada pela amnio e cordocentese ou pela biópsia de vilosidades coriais, visando ao diagnóstico precoce, conforme ilustrado na figura abaixo:



(*) Modificado de Montenegro e Rezende (1998)

Figura 1: Período para realização da coleta invasiva pré-natal (*)

Com o desenvolvimento fetal, as células se especializam em tecidos distintos, com funções variadas. O índice de multiplicação celular permanece alto, assim como as possibilidades de erros nas mitoses e conseqüente instalação de aberrações cromossômicas. Estima-se que a incidência de anomalias cromossômicas no estágio de zigoto seja de 20 a 50%, no total de concepções. Simpson (1990) relata que a maioria das perdas ocorre no primeiro trimestre, como abortos espontâneos decorrentes de falta de clivagem, associadas ou não a falhas de implantação (Munné et al, 1994; Benkhalifa et al, 1996).

Dentre os componentes do líquido amniótico, o epitélio de descamação fetal contribui com a maior porcentagem de células viáveis e passíveis de cultivo *in vitro*. Sua origem é dupla, de modo que a camada superficial ou epiderme é proveniente da ectoderme, enquanto que a camada interna tem origem mesodérmica (Lind et al., 1969). Quando maduro, o líquido amniótico é composto por: células eosinófilas, provenientes da boca fetal; células basófilas, provenientes da cavidade oral e vulva; células basófilas pequenas e com tendência à formação de grumos, originárias do trato urinário; células poligonais, originárias da epiderme. Desde os estágios iniciais do zigoto até a 32ª semana, as células apresentam diâmetro médio de 25 micras, são ovais ou cubóides e caracterizam-se por citoplasma basófilo, denso e micro-vacuolizado. O núcleo, centralmente disposto, apresenta uma rede cromatínica densa e homogênea, ao lado de um ou vários nucléolos. Entre a 32ª e 36ª semana de desenvolvimento, aparecem células cilíndricas contendo vacúolos citoplasmáticos distintos, sugerindo atividade secretora. O núcleo é redondo e vesicular, situado na base da célula (Huisjes, 1970). Durante o cultivo *in vitro*, os tipos celulares tornam-se indistintos morfológicamente, porém com grande número de células em metáfase que, após interrupção do ciclo com colchicina e tratamento hipotônico, estão passíveis de colorações específicas e análise citogenética.

Como recomendação geral, sugere-se a confirmação do diagnóstico citogenético com os achados ultra-sonográficos, seguidos de cordocentese. No entanto, nem todas as alterações encontradas no líquido amniótico estão presentes no sangue de cordão. Na cordocentese, o sangue de cordão umbilical é colocado em cultivo e estimulado com um mitógeno, geralmente fitohemaglutinina e, dentro de cerca de três dias, sofrem o mesmo procedimento descrito acima, sendo que o material é igualmente submetido a análise cromossômica.

Dependendo do momento de ocorrência do erro mitótico e da diferenciação celular, as alterações cromossômicas podem não se distribuir equitativamente entre os tecidos, originando mosaicos teciduais de constituição cromossômica diversa e, portanto, dependentes do momento e do tipo de coleta de material realizada.

Segundo Hsu (1986), as manifestações de mosaicismo ocorrem:

- nas células trofoblásticas e na mesoderme extra embrionária, gerando mosaicismo confinado à placenta;
- no embrioblasto sem afetar o hipoblasto, gerando um feto anormal;
- nas células totipotentes que dão origem ao epi e hipoblasto, gerando trofoblasto normal, com feto anormal;
- nas concepções trissômicas com correção nas células que dão origem ao epiblasto, gerando placenta trissômica e embrião dissômico.

Além destas alterações, interpretações equivocadas de mosaicismo podem ocorrer em situações especiais, decorrentes de condições técnicas advindas do processamento do material biológico ou de contaminação de coleta por tecido materno, situação presente em aproximadamente 0,2% das coletas (Hsu, 1986). Outros fatores de interferência são representados pelo reconhecimento de polimorfismos e identificação de cromossomos marcadores e contaminações do material biológico com micoplasma. Variações do pH do meio de cultura são variáveis igualmente importantes, uma vez que pequenas oscilações podem interferir no crescimento celular. Na literatura, Ford e colaboradores (1973) salientam a associação entre o pH alcalino do meio de cultura e a presença de aneuploidias, enquanto Scheneider (1975) demonstra que a contaminação com micoplasma induzia a um aumento de quebras cromossômicas casuais. Estas afirmações, contudo, não têm sido confirmadas na literatura mais recente.

Para sanar os problemas decorrentes do cultivo celular, os recursos da genética molecular têm oferecido algumas vantagens em relação ao método citogenético tradicional, possibilitando a coleta de pequena quantidade de material para análise. Os resultados são

mais rápidos e podem se valer de técnica automatizada, permitindo a análise de 36 a 96 amostras simultâneas, além de exigências mais flexíveis quanto à perícia na interpretação dos resultados (Verna et al, 1998).

Até o momento, a técnica mais empregada no diagnóstico pré-natal molecular é a amplificação seletiva de uma determinada sequência de DNA, mediante a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase). A PCR quantitativa foi primeiramente usada na investigação de aneuploidias do cromossomo X, mas sua aplicação tem se ampliado para as demais aneuploidias. Nesta técnica, são empregados micro-satélites de regiões cromossômicas específicas, marcados com corante fluorescente. As leituras são feitas por densitometria a laser, assistidas por sistemas computadorizados. Nos indivíduos com trissomia, ocorre a presença de um alelo adicional enquanto que, nas monossomias, haverá ausência do alelo. Amostras normais apresentam dois picos de amplificação de igual tamanho, amostras de indivíduos trissômicos são caracterizadas por três picos ou dois picos com padrão 2:1 (Pereira et al, 2000).

Mais recentemente, os programas de rastreamento têm se valido da citogenética molecular, através da técnica de FISH (fluorescence *in situ* hybridization), comprovando sua aplicação para situações específicas de investigação de aneuploidias, além de ser extremamente valiosa nas suspeitas de translocações e alterações cromossômicas estruturais, não identificadas pela citogenética convencional (Hulten et al, 1991)

Como aliados do diagnóstico pré-natal e especialmente importantes nos programas de rastreamento populacionais, alguns marcadores bioquímicos são empregados na detecção de cromossomopatias, dentre eles a alfa-fetoproteína (AFP) a gonadotropina coriônica humana (HCG), além do estriol não conjugado (uE3). A principal vantagem destes marcadores é que constituem método diagnóstico não invasivo e de menor custo, quando comparados aos anteriores.

A primeira observação da concentração sérica anormal de proteínas, na presença de anormalidades cromossômicas fetais, data de 1984, quando Merkatz e colaboradores observaram uma associação entre trissomia do cromossomo 18 e baixos níveis de alfa-fetoproteína. Esta é sintetizada pelo saco vitelino e, mais tarde, pelo fígado

fetal e trato gastrointestinal; sua concentração eleva-se no soro fetal a partir da sexta semana de gestação, e atinge seu nível máximo entre a 12ª e a 14ª semanas e, a seguir, cai gradualmente (Habib 1977). Pouca quantidade aparece no líquido amniótico ou na urina fetal; sendo a proporção no soro fetal/líquido amniótico de cerca de 200/1; quando o feto apresenta tubo neural aberto, como na anencefalia ou espinha bífida aberta, a AFP aparece em concentração aumentada no líquido amniótico, provavelmente por extravasamento do líquido cefalorraquidiano fetal (Lindenbaun et al 1987).

A alfa-fetoproteína pode ser detectada no soro materno 29 dias após a concepção (Gitlin et al, 1972), e seu nível aumenta com o progredir da gestação, atingindo o pico entre a 28ª e a 32ª semana e diminuindo gradativamente até o término (Gitlin 1975). A triagem do nível de alfafetoproteína no soro materno foi inicialmente realizada para identificar defeitos de tubo neural (Crandall et al, 1991). Níveis séricos baixos de AFP no soro materno estão associados a trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21, assim como a triploidias (Cuckle et al, 1984; Doran et al, 1986; Lindenbaum et al, 1987).

O padrão de detecção de Síndrome de Down, combinando idade materna e diminuição de AFP, no soro materno em segundo trimestre de gestação é de 25 a 33%, com um falso positivo de 5% (Cuckle et al, 1984; Ashwood et al, 1987). A alfafetoproteína apresenta também uma alta especificidade e sensibilidade para detecção de defeitos de fechamento de tubo neural, detectando entre 80 e 90% dos casos de espinha bífida e anencefalia (Marnie et al, 1991). Valores aumentados ou diminuídos de alfafetoproteína, no soro materno, estiveram ainda associados a 34% de defeitos congênitos maiores, compreendendo 19% dos natimortos e mortes fetais neonatais, 11% de complicações maiores na gravidez e 15% de sérias complicações no recém-nascido (Milunsky et al, 1989).

A gonatrofina coriônica humana (hCG) é uma glicoproteína de baixo peso molecular, composta de duas subunidades, α e β , produzida em estruturas ou líquidos orgânicos onde há tecido corial presente, nas células do sinciciotrofoblasto. No início da gestação, a principal função da hCG é a manutenção do corpo lúteo. Sob influência da hCG, o corpo lúteo produz hormônios como estrógeno, progesterona, relaxina e inibina (Hudson et al, 1984; Illingworth et al, 1990). A atividade funcional da hCG diminui

progressivamente até a décima semana de gestação, quando atinge níveis mínimos (Tulchinsky e Hobel 1973).

Os níveis séricos de β -hCG aumentam rapidamente, atingindo seu pico entre a 10ª e a 12ª semana de gestação, quando declinam progressivamente até a décima oitava semana e mantendo-se constante até o termo. A concentração de α -hCG aumenta gradualmente até a 36ª semana, quando atinge um nível que se manterá até o término da gestação (Suthers e Haan 1997). A hCG total e β hCG esta aumentada no soro materno na presença de gestação com Síndrome de Down, na neoplasia trofoblástica gestacional, na gravidez ectópica e na gestação gemelar (Munoz e Little, 1999); está diminuída nas trissomias do cromossomo 18 (Sfendrych et al, 1996) e nas triploidias (Vieira Neto et al, 1999). Existe uma associação entre níveis maternos elevados de hCG e gestação com aneuploidia fetal (Borgart et al, 1987). A dosagem de hCG, realizada em 77 gestações, revelou associação entre os seus níveis e a idade materna, com padrão de detecção de 60% nas Síndromes de Down e tendo 6,7% de casos falso positivos (Wald et al, 1988).

O estriol é produzido a partir da nona semana de gestação, sendo responsável pelo crescimento e maturação da supra renal, com conseqüente aumento da produção de cortisol fetal, importante na produção de surfactante, na regulação do armazenamento de glicogênio hepático e na maturação da medula da supra renal. É importante também no diagnóstico de gravidez de alto risco, quando associa maturidade a vitabilidade fetal, onde níveis ascendentes de estriol traduzem boa vitalidade. Diminuição de seus níveis em 40% ou mais significa sofrimento fetal crônico. O estriol está sensivelmente alterado nas patologias do SNC (anencefalia e hidrocefalia), nas patologias da supra renal (hipoplasia cortical congênita, supressão iatrogênica por corticoterapia materna, cirrose hepática fetal congênita), nas anomalias placentárias (deficiência enzimática, diminuição da área útil) e anormalidades maternas (insuficiência hepática, doença renal ou cortica-supra-renal) (Peixoto, 1991).

No soro materno, a maior parte do estriol é conjugada no fígado e uma porcentagem de aproximadamente 10% permanece não conjugada. Aproximadamente 65% a 70% do estriol conjugado e não conjugado (uE3) ligam-se a proteínas carregadoras, sendo que apenas o estriol livre tem atividade biológica (Compton et al, 1979). A concentração

de uE3 é reduzida em mulheres fumantes e nos casos de imaturidade fetal, sendo que seus níveis são independentes da idade materna (Munoz e Little, 1999). Baixos níveis de estriol não conjugados, no soro materno no segundo trimestre de gestação, são sugestivos de trissomias do cromossomo 21 (Carnick et al, 1988), do cromossomo 18 (Sfendrych et al, 1996) ou de triploidias (Vieira et al 1999). Utilizando o teste tríplice (AFP, hCG e uE3) para detecção de Síndrome de Down, o padrão de detecção é de 77% , com um falso positivo de 4,6%, quando em associação com a idade materna. Na ausência de dosagem de estriol, os valores caem para 48% (Marnie et al, 1991).

Apesar dos recursos relatados acima constituírem importantes avanços no campo do diagnóstico pré-natal, na verdade nenhum deles dispensa a análise citogenética convencional para o diagnóstico final, o que implica na realização de exames relativamente onerosos, que requerem períodos longos de operacionalização e pessoal especializado. No Brasil, estes serviços são realizados, em sua imensa maioria, em serviços privados. Como consequência, ocorre a posterior sobrecarga na rede pública de atendimento a portadores de enfermidades genéticas, com prognóstico e evolução extremamente reservados, em razão da natureza crônica dessas doenças e agravamento do problema em determinados agregados familiares.

Considerando a relevância destas questões e o impacto sócio-econômico gerado na criação e operacionalização de um Serviço de Medicina Fetal, julgamos oportuno investigar a participação do laboratório de citogenética no auxílio às estratégias de diagnóstico pré-natal, num hospital público de referência da rede terciária do estado de São Paulo, através do estudo das características específicas da população atendida, da prevalência de malformações cromossômicas e das implicações no atendimento integral à saúde da mulher.



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

* Analisar a contribuição do Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular/CAISM no Programa de Medicina Fetal, no que concerne ao padrão de qualidade de exames, abrangência de suas atividades e atendimento às gestantes em um centro de referência.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- * Investigar as anomalias cromossômicas detectadas em amostras de líquido amniótico e de sangue de cordão umbilical, provenientes de gestantes advindas do ambulatório Pré-Natal Especializado (PNE).
- * Comparar a prevalência das alterações cromossômicas encontradas com os dados de literatura.
- * Estabelecer relações entre achados clínicos e ultra-sonográficos.
- * Identificar quais as indicações representam maiores fatores de risco para alterações cromossômicas, na população de gestantes estudada.
- * Descrever a população sob estudo segundo as variáveis: idade, idade gestacional, número de abortos, número de gestações.
- * Comparar as variáveis descritivas da população entre os grupos de alto e baixo risco para alterações cromossômicas.



CASUÍSTICA E MÉTODOS

Amostra

O estudo retrospectivo delineado compreendeu o levantamento de dados correspondentes a todas as solicitações de cariótipo atendidas pelo Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular, no período de abril de 1993 a novembro de 2001. As indicações de cariótipo obedeceram aos critérios de inclusão estabelecidos pelo protocolo do Programa de Medicina Fetal do CAISM e as coletas de amostras de material fetal foram realizadas após assinatura de termo de consentimento para procedimentos invasivos (anexo 1).

A amostra foi subdividida em dois grupos, em razão das indicações de cordo ou amniocentese para suspeita clínica de toxoplasmose, rubéola ou citomegalovírus e isoimunização Rh, que, teoricamente, não deveriam apresentar alterações cromossômicas numéricas ou estruturais detectáveis. Entretanto, como visavam à utilização de procedimentos invasivos e terapêuticos intra-útero, com alterações morfológicas decorrentes de comprometimentos sujeitos a confirmação sorológica, julgou-se procedente realizar, nos primeiros três anos de estudo, a investigação citogenética destes fetos, que constituíram neste trabalho o grupo controle.

O grupo de estudo foi constituído pelos casos com indicação precisa de cariótipo, representadas pela idade materna superior a 40 anos, gestação anterior com malformação congênita/genética/bioquímica, história familiar de alteração cromossômica, além de gestação atual com alterações ecográficas.

Encaminhamentos

Como centro de referência, o Programa de Medicina Fetal (PMF) do Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) recebe gestantes oriundas do Ambulatório Geral de Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, dos postos de saúde pública da região de Campinas e de outros centros que não possuem serviço de Medicina Fetal estabelecido, abrangendo várias regiões do Estado de São Paulo e a região sul do Estado de Minas Gerais. O atendimento clínico destes encaminhamentos é realizado no Ambulatório Pré Natal Especializado (PNE).

As gestantes foram atendidas mediante encaminhamento justificado como fator de risco para comprometimento materno e/ou fetal, compreendendo as indicações de alterações morfológicas e/ou funcionais fetais, histórico familiar de anomalias genéticas, idade materna acima de 40 anos, infecções por microorganismos com potencial contaminação fetal, além de comprometimento resultante de incompatibilidade sanguínea materno/fetal, entre outros.

Após admissão no ambulatório PNE, as gestantes foram atendidas pelas assistentes sociais ou enfermeiras, ocasião em que foram orientadas quanto aos procedimentos de rotina e exames auxiliares, incluindo exames ultra-sonográfico, testes sorológicos para HIV e biópsias fetais para exames adicionais, além de outros procedimentos como transfusão intra-útero. Desta forma, procedimentos invasivos foram realizados apenas após a assinatura do termo de consentimento (anexo 1). A partir deste momento e de acordo com a solicitação médica ou pessoal, as gestantes foram encaminhadas para atendimento psicológico, com acompanhamentos periódicos ao longo do período perinatal.

Realizados o atendimento ambulatorial e as solicitações de exames de rotina para o atendimento pré-natal, as mulheres foram encaminhadas para exame ultra-sonográfico. Em posse da propedêutica especializada, cada caso foi discutido em reuniões multidisciplinares do Serviço, onde foram decididas as indicações para exames especializados e tomada de conduta. Os procedimentos invasivos foram realizados após assinatura do termo de consentimento e posse dos resultados de triagem para HIV e hepatite B e C, em salas apropriadas, na presença de uma enfermeira e do docente e residente responsáveis, em ambiente asséptico, com auxílio de aparelho ultra-sonográfico de alta resolução (Toshiba SSA 250 ou Toshiba SH 140). (Figura 2).

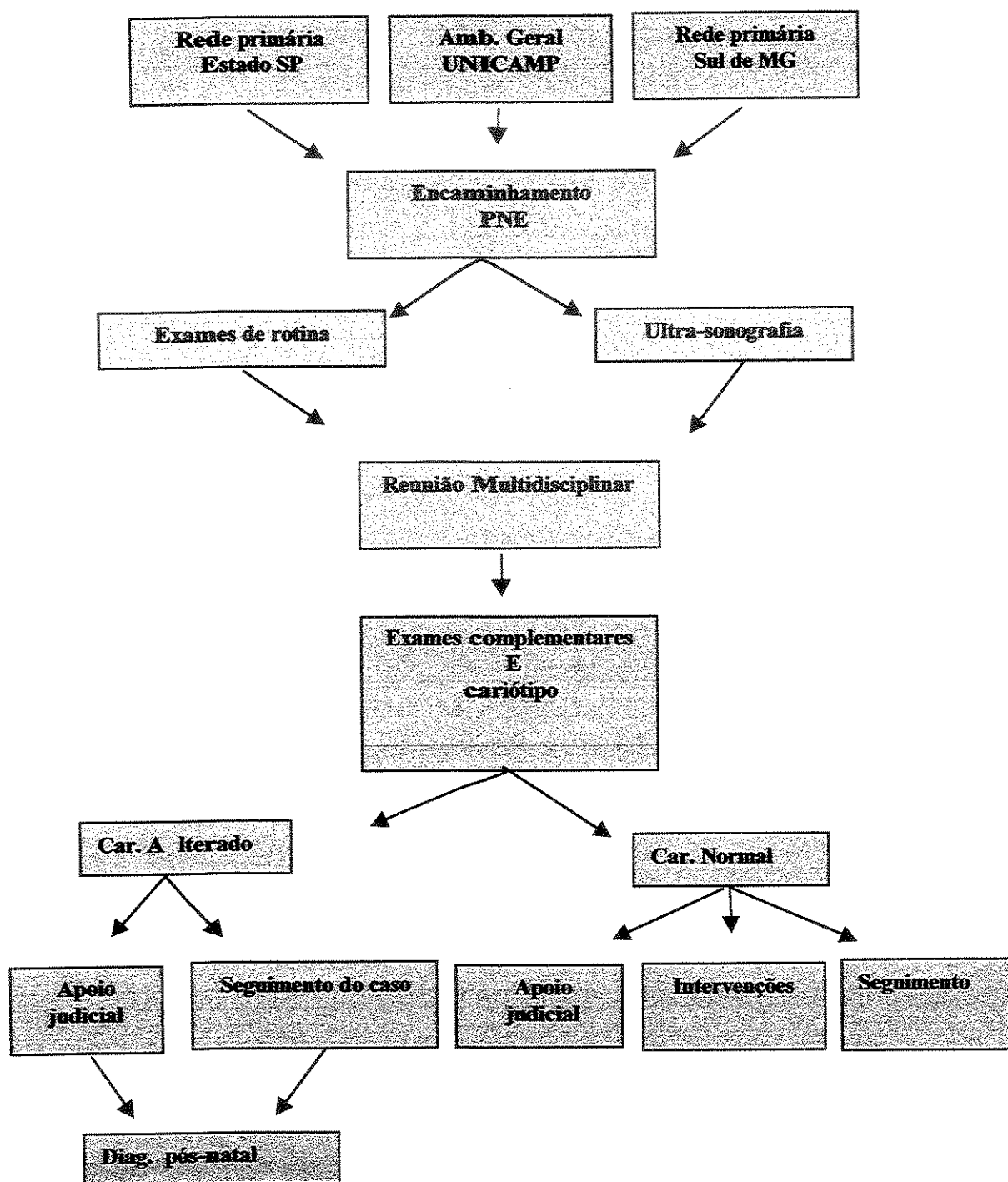


Figura 2: Esquema do sistema de atendimento realizado no Programa de Medicina Fetal (PMF)

PROCEDIMENTOS AMBULATORIAIS

Coleta de sangue de cordão umbilical

Após posicionamento da gestante em decúbito dorsal horizontal, procedeu-se à anti-sepsia rigorosa do abdômem, com colocação de campos cirúrgicos e aplicação de anestésico local. A coleta foi realizada por dois operadores, com auxílio do aparelho ultra-sonográfico.

A agulha utilizada foi previamente, introduzida com o mandril até a cavidade amniótica e direcionada até a inserção placentária do cordão umbilical. Atingido o cordão, a agulha foi inserida (calibre 20) na veia umbilical, sendo então retirado o mandril e aspirado 3 a 4 ml de sangue fetal. Amostra adicional de 1 ml deste sangue era colhida concomitantemente em outro frasco contendo anticoagulante EDTA, para reação de Kleihauer e contagem de hemácias fetais, de modo a constatar a ocorrência de contaminação com sangue materno. Retirada a agulha, a hemorragia local foi acompanhada pela ultra-sonografia, até ocorrer a parada de sangramento.

Finalizado o procedimento, realizou-se o controle da frequência cardíaca fetal, nova assepsia e a paciente então foi dispensada, com recomendações de repouso durante 24 horas e levando um telefone para contato, em caso da presença de intercorrências ou desconforto excessivo.

As coletas foram realizadas, via de regra, no período da manhã, tendo sido o material biológico mantido em local apropriado, à temperatura ambiente e, dentro de um período máximo de 4 horas após a coleta encaminhado ao laboratório.

Coleta de líquido amniótico

De modo inicialmente semelhante ao descrito acima, o transdutor foi protegido com plástico estéril, utilizando-se como veículo gel estéril. Ocasionalmente foi utilizada anestesia local com lidocaína 2%. Após a escolha do local a ser puncionado, a agulha (espinhal calibre 20 ou 22) foi inserida ao lado do transdutor até a cavidade uterina. Retirado o mandril, 10 ml de líquido amniótico foram aspirados. Os demais procedimentos foram idênticos aos descritos acima.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Recebimento das amostras

As amostras coletadas foram obrigatoriamente enviadas até as 14 horas do dia da coleta para o laboratório, onde recebiam registro informatizado e numeração interna do sistema. Três etiquetas eram impressas, sendo uma afixada sobre a folha de solicitação de exame, uma na seringa contendo o material fetal e outra no livro de registro de entrada de material. Imediatamente após, o material e a respectiva requisição eram fixados juntos e transferidos para a sala de cultivo celular.

Técnica convencional de cultura primária de líquido amniótico

10 ml de líquido amniótico foram colocados em tubo estéril (Nunc) e submetidos à centrifugação durante dez minutos, a 1.000 RPM. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de meio Ham F10 e 0,2 ml deste total foram colocados em tubo estéril com tampa ventilada, contendo 5 ml de meio de cultura enriquecido com 10% de complementos, sendo soro fetal bovino e suplemento Amniomax (Gibco).

O material foi submetido a incubação a 37 °C, durante 10 a 12 dias, em estufa com 5% de CO₂.

A interrupção da divisão celular foi feita com colchicina Sigma (0,1 µg/ml). Após intervalo de 3 horas, as células aderidas foram removidas com tripsina, e o material transferido para tubo estéril (Nunc) para centrifugação, por 10 minutos, a 1.000 RPM.

O tratamento hipotônico foi feito com KCl 0,075 M e a fixação do material com metanol/ácido acético (3:1), sendo este transferido para lâminas geladas para posterior realização de coloração convencional, banda G e/ou C e análise citogenética.

Técnica de cultura primária de líquido amniótico e cariótipo *in situ*

10 ml de líquido amniótico foram colocados em tubo estéril (Nunc) e submetidos à centrifugação durante dez minutos, a 1.000 RPM. O sedimento foi ressuspensão em 1 ml de meio Ham F 10 e distribuído em placas de cultivo celular (Nunc) contendo quatro nichos, acrescidos de lamínula Thermanox Nunc ®.

Em dois nichos foram acrescidos 4 ml de meio de cultura Ham F10 enriquecidos com 20% de soro fetal bovino e 10% de suplemento Amniomax; aos dois nichos restantes foram acrescentados 4 ml de meio Amniomax com 15% de suplemento Amniomax.

O material foi incubado a 37 °C, durante 8 a 10 dias em estufa com 5% de CO₂. Realizava-se troca do meio de cultura no 5º dia de cultivo.

A interrupção da divisão celular foi feita com colchicina (0,1 µg/ml). Após três horas, foi realizado o tratamento hipotônico com KCl 0,075M e a fixação do material com metanol/ácido acético (3:1). A coloração das lâminulas foi realizada para obtenção de banda G e/ou C e análise citogenética.

Análise Citogenética

Realizada através de bandas G e C, segundo técnica descrita por Sanchez et al. (1973), com pequenas modificações. Os resultados de cariótipo foram descritos segundo os critérios da ISCN (1995), com limite de resolução mínimo de 450 bandas por lote haplóide. A avaliação foi realizada em material advindo de, no mínimo, dois frascos de cultura e de 20 células em metáfase, seguindo as recomendações de Hsu (1992) para investigação de mosaicismo.

Coleta de dados e Análise Estatística

As variáveis estudadas compreenderam a idade das mulheres e idade gestacional na admissão no serviço, número de gestações e de abortos, indicação principal de cariótipo e os respectivos resultados. Os dados foram compilados de consulta aos respectivos prontuários e ao arquivo de dados do Laboratório de Citogenética e Cultivo Celular. Na descrição das amostras, os valores decimais foram aproximados para o limite superior, quando maiores que 0,6 ou inferior, se menores ou iguais a 0,5. Foram calculadas a razão de prevalência (RP), com intervalo de confiança de 95%, ajustadas segundo a idade, idade gestacional e número de gestações, em relação ao grupo controle, utilizando o modelo de regressão de Breslow-Cox.



RESULTADOS

As solicitações encaminhadas ao laboratório corresponderam a 673 casos, sendo 146 que atenderam aos critérios estabelecidos para o grupo controle e 527 para o grupo de estudo, perfazendo 546 casos provenientes de cordocentese (81%) e 127 de amniocentese (19%).

No grupo controle, uma relação de 80 fetos do sexo masculino para 66 do sexo feminino mostrou desvio favorável aos primeiros (55%). Conforme esperado, não houve alterações cromossômicas numéricas ou estruturais detectáveis, exceto os polimorfismos citogenéticos representados por quatro casos de variações nas regiões de heterocromatina (46,XY, 22s+; 46,XX,inv(9); 46,XX,1qh- e 46, XY,1qh+).

No grupo de estudo, a distribuição segundo a idade, mostrou que, das gestantes, 14% apresentava idade superior a 35 anos, e alterações citogenéticas fetais entre 24 e 29%, contrapondo-se à ausência de alterações no grupo de adolescentes com idade inferior a 15 anos. Por outro lado, apenas 16% das mulheres procurou o serviço com idade gestacional inferior a vinte semanas, denotando um importante contingente de 3% de gestações a pré-termo e concentração quase absoluta de mulheres entre o segundo e terceiro trimestres de gestação, sem concentração de alterações citogenéticas em qualquer dos intervalos de classe (tabelas 2 e 3/figuras 3 e 4).

Tabela 2: Distribuição da amostra de gestantes do grupo sob estudo segundo a faixa etária, quando admitidas no serviço.

Idade	n	%	n alterados	% alterados/classe
≤ 15	11	2	0	0
16-20	100	20	11	11
21-25	118	24	21	18
26-30	127	26	17	13
31-35	69	14	07	10
36-40	42	9	10	24
≥41	24	5	07	29
Total	491	100	73	

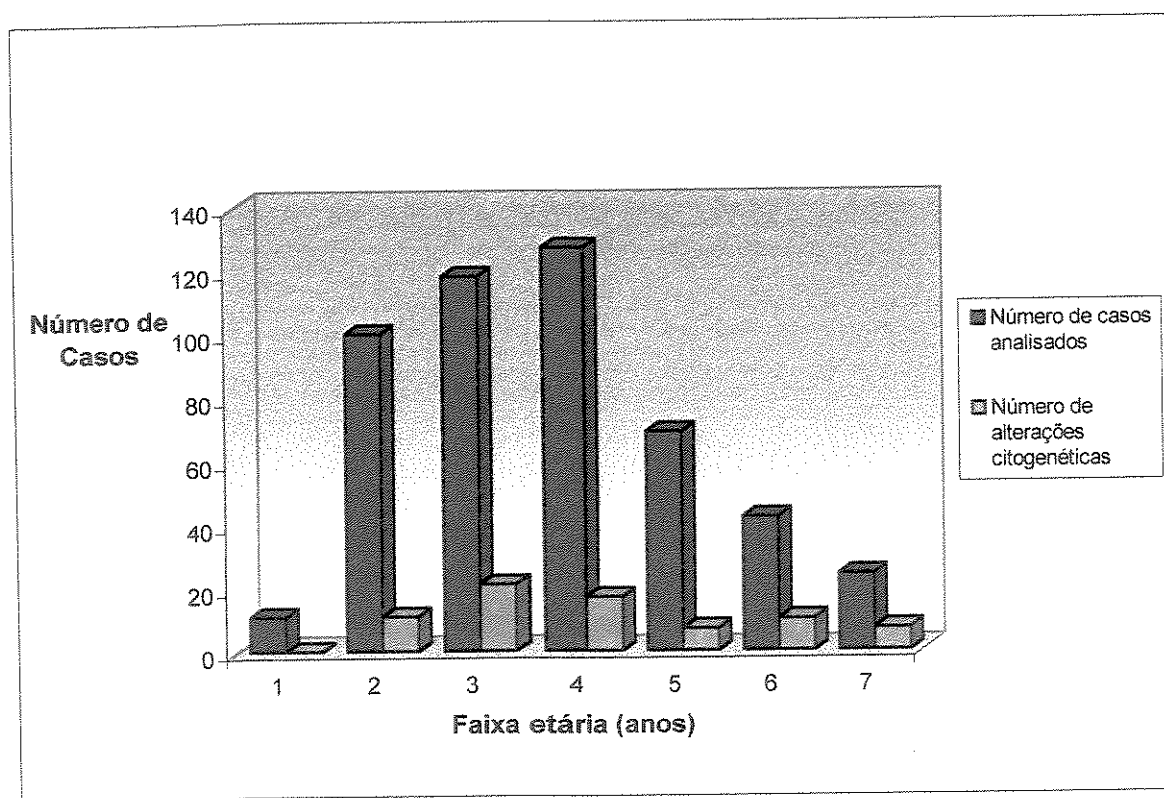


Figura 3: Distribuição do grupo de estudo segundo a faixa etária das gestantes

Tabela 3: Distribuição da amostra de gestantes do grupo sob estudo segundo a idade gestacional, quando admitidas no serviço.

Idade	n	%	Alterados	% alterados/ classe
12 - 15	18	4	02	11
16 - 20	59	12	05	9
21 - 25	124	25	19	15
26 - 30	167	34	24	14
31 - 35	108	22	18	17
36 - 40	15	3	05	33
Total	491	100	73	

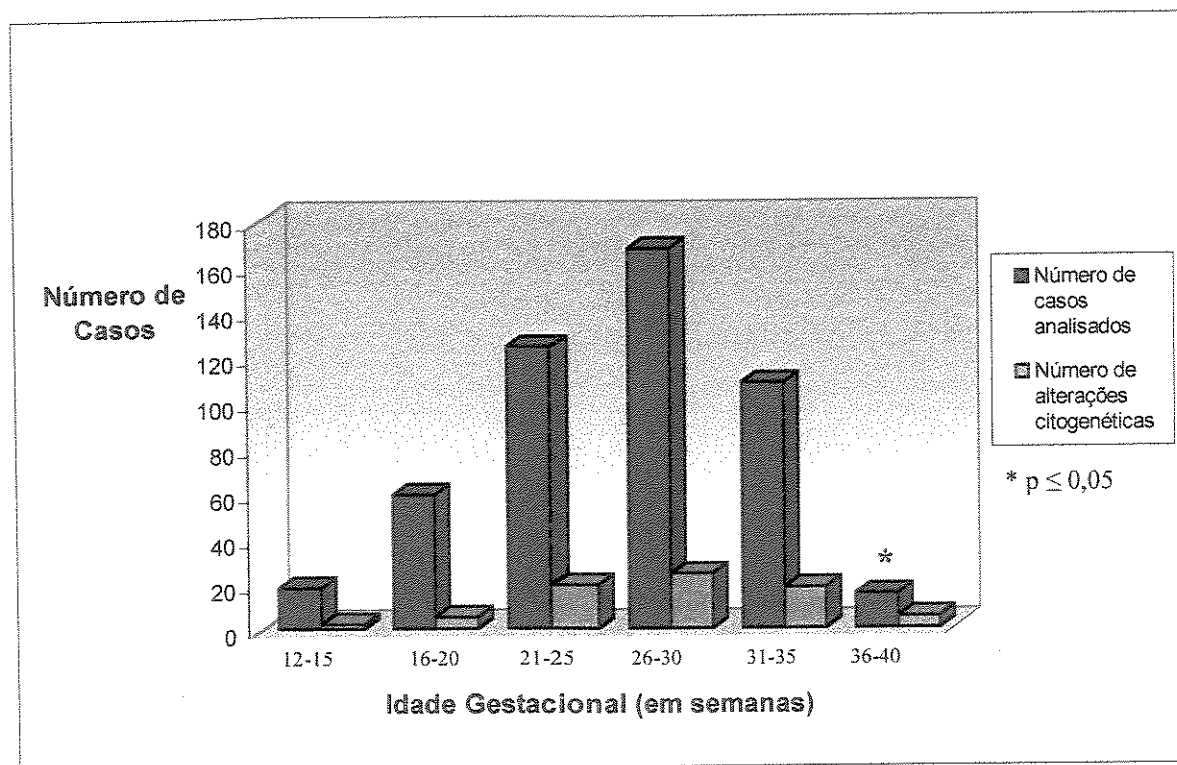


Figura 4: Distribuição da amostra de gestantes segundo a Idade Gestacional

Quanto ao número de gestações do grupo de estudo, a tabela 4 mostra uma distribuição equivalente entre primigestas e aquelas com 2 a 3 gestações, compondo 79% da amostra. Os percentuais de alterações citogenéticas estiveram igualmente distribuídos entre os três intervalos de classe obtidos.

Tabela 4: Distribuição do grupo de estudo segundo o número de gestações

Número de Gestações	n	%	n alterados	% alterados/classe
1	192	39	26	14
2 - 3	195	40	32	16
≥ 4	104	21	15	15
Total	491	100	73	

A investigação de histórico de abortos revelou 81% da amostra sem antecedentes pessoais, contrapondo-se a 19% com relato de perdas gestacionais. As alterações citogenéticas fetais, entretanto, mantiveram-se distribuídas eqüitativamente nos variados intervalos de classe (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição do grupo de estudo segundo o número de abortos

Abortos	n	%	n alterados	% alterados/classe
0	399	81	58	15
1	62	13	9	15
2	16	3	3	19
≥3	14	3	3	21
Total	491	100	73	

No grupo de estudo, o número de solicitações oscilou entre 40 e 90 ao ano, com um aumento importante no biênio 98/99. Destas, 36 resultaram em solicitação de nova punção (5%), em razão de falhas na obtenção da cultura primária ou de metáfases passíveis de análise citogenética. As falhas distribuíram-se uniformemente ao longo dos anos, apesar da experiência e da melhoria de recursos adquiridos no período (Tabela 6/figura 5). A média geral de alterações citogenéticas foi de 14%, com aumento importante no ano de 1999 (figura 6).

Tabela 6: Distribuição da amostra segundo ano de entrada dos exames no laboratório, falhas na obtenção de cariótipo e percentuais de alterações cromossômicas.

Ano de entrada	n solicitações	n falhas (%)	n alterados (%)
1993	14	0	1 (7%)
1994	66	5 (7%)	5 (8%)
1995	49	4 (8%)	12 (24%)
1996	54	5 (9%)	7 (13%)
1997	67	5 (7%)	5 (7%)
1998	89	5 (6%)	11 (12%)
1999	87	6 (7%)	16 (18%)
2000	60	2 (3%)	7 (12%)
2001	41	4 (10%)	9 (22%)
Total Geral (média no período)	527	36 (7%)	73 (13%)

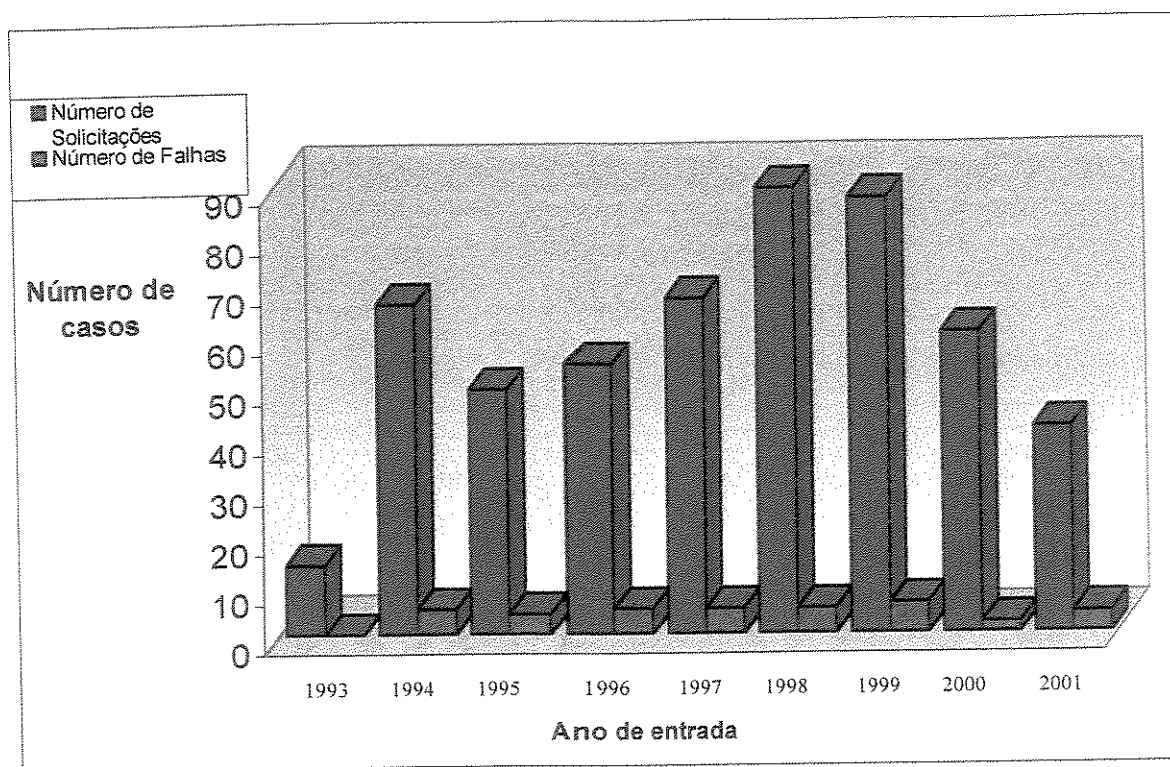


Figura 5: Solicitações de cariótipo e falhas ocorridas no período de 1993 a 2001

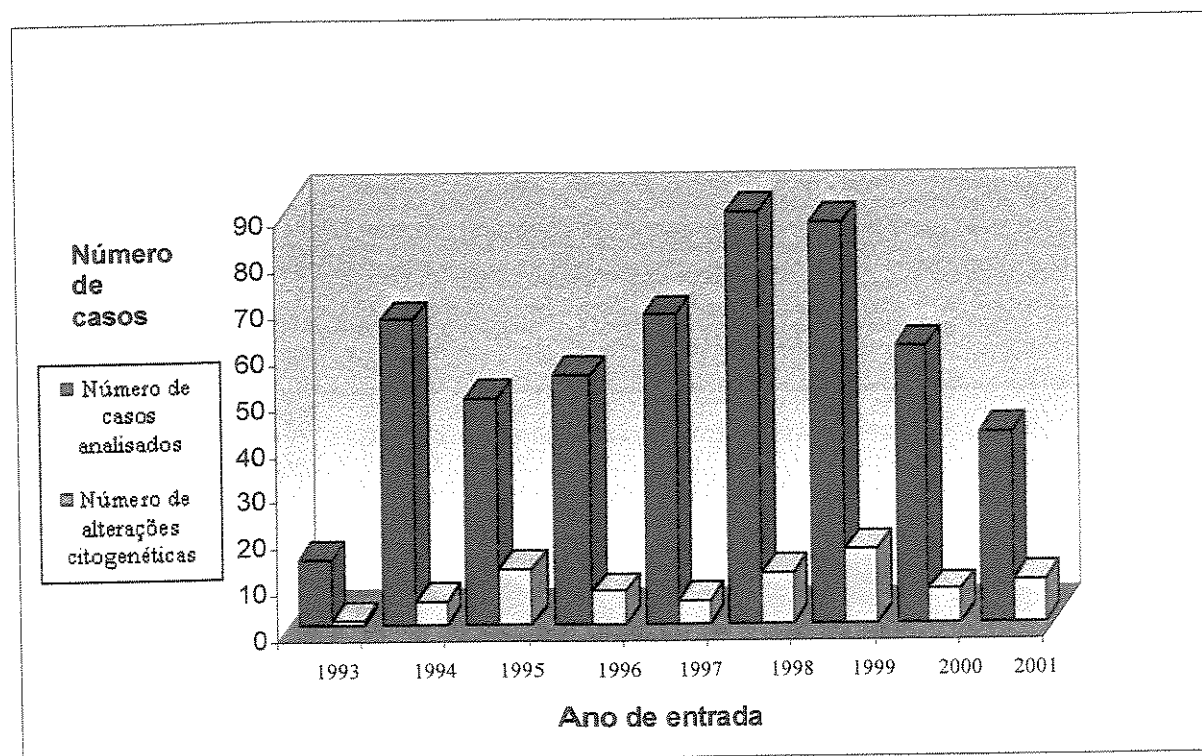


Figura 6: Solicitações e alterações cromossômicas ocorridas no período de 1993 a 2001

Das principais indicações de cariótipo, 41% foram decorrentes de alterações do sistema nervoso central (SNC), especialmente hidrocefalia e defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN). Outras malformações de SNC isoladas e presença de Cisto de Dandy-Walker revelaram que pelo menos 20% destes casos eram portadores de alterações cromossômicas, concentrando 14% de todas as alterações citogenéticas observadas na amostra (Tabela 7).

Histórico de filhos com malformações fetais ou congênitas, associadas ou não a cromossomopatias ou alterações genético/bioquímicas, contribuíram com 9% dos casos, enquanto que defeitos do sistema urinário e hidropsia contribuíram com 8% e 7% respectivamente. Idade materna superior a 40 anos e malformações fetais múltiplas participaram com contingente, superior a 9% das indicações de cariótipo. Indicações variadas com número inferior a quatro ocorrências foram incluídas em uma única classe. Compreenderam alterações como artéria umbilical única, derrame pleural, gestações gemelares com alterações ecográficas em um ou ambos fetos, entre outras. Considerando-se as alterações citogenéticas por classe, verificou-se que o índice de afetados ultrapassou 20% nas cardiopatias estruturais, onfaloceles, higromas císticos e retardo de crescimento intra-uterino, assim como nas indicações de idade materna avançada. As alterações numéricas mais freqüentes foram as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21, seguidas pelas monossomias do cromossomo X, sendo uma delas em mosaico. As alterações estruturais perfizeram 11% das ocorrências e alterações menos freqüentes totalizaram três casos com os seguintes cariótipos: 48,XXY,+21; 47,XX,+8; 47,XX,der(13/21),+21,+mar (Tabela 8). Os polimorfismos citogenéticos compreenderam cinco casos de aumento de satélite nos cromossomos 13, 15, 21 e 22 e 1 caso de inversão pericêntrica do cromossomo 9.

Tabela 7: Indicações de cariótipo e alterações cromossômicas encontradas no grupo de estudo

Indicações	n	Alterados	% alterados
Alterações do SNC			
Hidrocefalia	137	10	7
DFTN	31	5	16
Cisto de Dandy-Walker	9	2	22
Outros	26	8	31
Total Parcial	203	25	
Defeitos de parede			
Onfalocele	15	3	20
Gastrosquise	4	0	0
Total Parcial	19	3	
Cardiopatias			
Defeitos estruturais	17	5	29
Arritmias	1	0	0
Total Parcial	18	5	
Defeitos do sistema urinário	38	4	10
Defeitos no trato gastro intestinal	5	1	20
Alterações ósseas	08	00	0
Antecedentes (*)	45	03	7
Hidropsia	33	06	18
Idade materna avançada	22	05	23
Malformações múltiplas	22	07	32
Alterações no líquido amniótico	16	01	6
Translucência nucal aumentada	15	02	13
RCIU	11	04	36
Hérnia diafragmática	11	01	9
Higroma cístico	08	02	25
Outras indicações	17	04	24
Total Parcial	251	25	
TOTAL GERAL	491	73	
RCIU= restrição de crescimento intra-uterino (*)= antecedentes de alteração cromossômica/			
DFTN= defeito de fechamento de tubo neural malformação fetal ou congênita			

Tabela 8: Alterações citogenéticas encontradas no grupo de estudo.

Cariótipo	n	XX	XY	% de alterações
47, ___+21	16	8	8	22
47, ___+18	17	9	8	23
47, ___+13	12	8	4	16
Alterações estruturais	08	4	4	11
Triploidias	03	3	0	4
Total Parcial	56	32	24	76

Outras alterações compreenderam : 45,X (7 casos); 45, X/46,XX (1 caso) e as aneuploidias 48,XXY,+21; 47,XX,+8; e 47,XX,der (13/21),+21,+mar.

Polimorfismo: 6 casos, sendo 3 do sexo masculino e 3 do feminino

A comparação estatística entre os grupos de estudo e controle indicou similaridade entre ambos quanto à idade gestacional e número de gestações, salientando-se para o primeiro um aumento significativo de alterações cromossômicas nas gestantes com idade superior a 35 anos (tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Comparação entre o grupo controle e o grupo de estudo

	com indicação (n = 491)		“controles” (n = 146)		p valor
	n	(%)	n	(%)	
faixa etária					0,04
14 a 15	11	(2)	1	(1)	
16 a 20	100	(20)	22	(15)	
21 a 25	118	(24)	47	(32)	
26 a 30	127	(26)	43	(29)	
31 a 35	69	(14)	16	(11)	
36 a 40	42	(9)	16	(11)	
≥ 41	24	(5)	1	(1)	
idade gestacional					0,12
12 a 15	18	(4)	8	(5)	
16 a 20	59	(12)	27	(19)	
21 a 25	124	(25)	35	(24)	
26 a 30	167	(34)	51	(35)	
31 a 35	108	(22)	24	(16)	
36 a 40	15	(3)	1	(1)	
gestações					0,02(+)
1	192	(39)	39	(27)	
2 a 3	195	(40)	71	(48)	
≥ 4	104	(21)	36	(25)	
abortos					0,16
0	399	(81)	118	(81)	
1	62	(13)	21	(14)	
2	16	(3)	7	(5)	
≥ 3	14	(3)	0	(0)	
polimorfismos					0,19(*)
sim	6	(1)	4	(3)	
não	485	(99)	142	(97)	

(*) Ajustado por idade, idade gestacional e número de gestações

(+) Significância estatística

Tabela 10: Razões de prevalência das alterações cromossômicas por faixa etária, idade gestacional, número de gestações e número de abortos, calculadas para o grupo de estudo.

faixa etária	<i>n</i>	alterações	Prevalência de alterações (%)	Razão de prevalências (IC 95 %)
14 a 15	11	0	0	-
16 a 20	100	11	11,0	referência
21 a 25	118	21	17,8	1,6 (0,8 – 3,2)
26 a 30	127	17	13,4	1,2 (0,5 – 2,5)
31 a 35	69	7	10,1	0,9 (0,3 – 2,3)
36 a 40	42	10	23,8	2,2 (1,0 – 4,7) (+)
≥ 41	24	7	29,2	2,7 (1,1 – 6,1) (+)
idade gestacional				
12 a 15	18	2	11,1	referência
16 a 20	59	5	8,5	0,8 (0,2 – 3,6)
21 a 25	124	19	15,3	1,4 (0,4 – 5,4)
26 a 30	167	24	14,4	1,3 (0,3 – 5,0)
31 a 35	108	18	16,7	1,5 (0,4 – 5,9)
36 a 40	15	5	33,3	3,0 (0,7 – 13,3)
gestações				
1	192	26	13,5	referência
2 a 3	195	32	16,4	1,2 (0,7 – 2,0)
≥ 4	104	15	14,4	1,1 (0,5 – 1,9)
abortos				
0	399	58	14,5	referência
1	62	9	14,5	1,0 (0,5 – 1,9)
2	16	3	18,8	1,3 (0,4 – 3,7)
≥ 3	14	3	21,4	1,5 (0,5 – 4,1)
total	491	73	14,9	

(+) Significância estatística



DISCUSSÃO

A implantação do Programa de Medicina Fetal teve seu início no ano de 1993, ocasião em que os casos eram selecionados e enviados para o Ambulatório Pré-Natal Especializado. Através do trabalho de assistentes sociais, enfermeiras e psicólogas especializadas, eram estabelecidos os primeiros contatos e os vínculos necessários entre os usuários e a equipe técnica, composta por ultra-sonografistas, clínicos, neonatologistas, cirurgiões pediátricos e geneticistas, estes amparados pelos laboratórios de análises de rotina e pelos laboratórios especializados, de modo a compor uma equipe multidisciplinar.

As solicitações de cariótipo sofreram flutuações durante o período de estudo, refletindo as dificuldades iniciais de implantação e introdução de novas rotinas (Tabela 6; Figura 5). Imediatamente após houve um período máximo de solicitações, seguido de queda e posterior estabilização destas, refletindo a experiência adquirida no período e o aprimoramento na indicação precisa de exames de maior monta.

As flutuações de demanda do laboratório não tiveram ligação com as falhas técnicas ocorridas, cujos níveis estiveram relativamente estáveis no período, apesar da experiência adquirida não somente nos serviços prestados ao Programa de Medicina Fetal, como também aos demais ambulatórios do Hospital da Mulher (Ginecologia, Esterilidade e Abortos Recorrentes). Assim, embora atendendo à recomendação de Hsu e colaboradores (1992) quanto à cota mínima de 100 análises anuais, os percentuais de falhas foram atribuídos, em parte, às condições insatisfatórias de infra-estrutura, altamente dependentes de fatores externos e por isso de difícil controle, representados pelos cortes de energia elétrica, mudança de lotes e de partidas de suprimentos e atrasos no fornecimento de material, entre tantos outros. Além de situações desta natureza, é muito provável que a manutenção dos índices de falha ao longo do período esteja relacionada ao momento das coletas que, na população estudada, correspondia a grande contingente de gestações a pré-termo ou de terceiro trimestre, consideradas na literatura como facilitadoras de falhas na cultura de células de líquido amniótico (Reid et al., 1996; Lam et al., 1998).

Paralelamente, as cromossomopatias também apresentaram flutuação importante no período, as quais não estão devidamente esclarecidas (Tabela 6; Figura 5). Os percentuais médios, contudo, estiveram dentro das estimativas mencionadas na literatura (Be et al., 1999; Caron et al., 1999).

A razão de sexo obtida a partir dos cariótipos indicou desvio favorável para fetos masculinos (52%), que foi mais acentuado no grupo controle (55%), confirmando os dados da literatura. Recentemente, Manning e seu grupo (1997) atribuíram este desvio à diferença entre a idade paterna e materna, mas esta conclusão não tem sido confirmada (Arnold, et al. 1997). Outros trabalhos têm sugerido um envolvimento ainda desconhecido de toxinas que “carregariam” o cromossomo Y no espermatozóide (Moller, 1996; Van der Pal de Bruin, et al 1997; Allan, et al. 1997).

Embora o desvio da razão de sexo para o sexo masculino seja um relato freqüente na literatura, as causas ainda não estão devidamente esclarecidas (Böttcher-Luiz, 1996). Dados recentes acerca de abortos espontâneos registrados no Chile, indicam uma razão de sexo de 1.03% (Be et al, 1997). Curiosamente, têm sido relatadas diminuições destas relações nos países industrializados, como na Dinamarca (Moller, 1996), na Holanda (Van der Pal de Bruin, et al 1997; Broman e Jackel, 1997), na Alemanha (Van den Broek, 1997) na Inglaterra (Manning, et al 1997), nos Estados Unidos e no Canadá (Allan, et al. 1997; Davis, et al. 1998), mas o fenômeno ainda não apresenta explicações plausíveis.

De modo semelhante, a associação entre alteração cromossômica fetal e idade materna avançada tem sido ressaltada desde a década de setenta e persiste como fator de risco principal nas indicações de cariótipo dos países desenvolvidos (Boué e Boué, 1976; Boué e Gallano, 1984; Hsu, 1986). No Brasil, a atenção destinada às gestantes na faixa de risco visa a prevenção de possíveis intercorrências clínicas e/ou obstétricas (Monteiro et al., 2000; Ministério da Saúde, 2000), sendo o diagnóstico citogenético uma alternativa remota e raramente exequível. Como agravante desta situação, a prevalência de gestações a pré-termo ou superiores a 20 semanas, obtida na casuística (Tabela 3; Figura 4), características de rede terciária do país, ressalta as limitações quanto às ações preventivas e terapêuticas, além do ônus compulsório aos setores de obstetrícia e neonatal dos hospitais.

A idade gestacional recomendada para a realização da amniocentese clássica situa-se entre a 16^a e 18^a semana, cujo risco de perda fetal pelo procedimento é de aproximadamente 0,5% (Montenegro, et al.; 1998). Entretanto, em razão da necessidade de cultivo celular, a disponibilidade de resultado é via de regra tardia, ocorrendo cerca de 10 a 12 dias após a coleta. A amniocentese precoce, realizada antes da 14^a semana de gestação,

permite a adoção de medidas igualmente precoces, mas a taxa de perda fetal pode chegar a 5,3% (Nicolaidis et al., 1994). Nikkilä e colegas (2002) relatam ainda o risco aumentado para deformidades congênitas de extremidades, especialmente malformações dos pés. Considerando as características da população estudada e a otimização de recursos financeiros como condição fundamental para os sistemas de saúde públicos, a indicação de cariótipo via cordocentese resultaria em diagnóstico mais rápido e menos oneroso à instituição. Para as gestações de segundo trimestre, os avanços nos sistemas de imagens ultra-sonográficas, associados à segurança da amniocentese neste período constituiriam também a opção ótima para avaliação destes fetos, uma vez que os marcadores bioquímicos, em especial a AFP (alfa-fetoproteína) não discriminam as gestações de alto risco para este período (Mandrizzato et al., 2001; Watanabe et al., 2002).

Com relação às alterações cromossômicas encontradas, os resultados obtidos confirmaram a alta proporção destas em função da principal indicação de cariótipo e a prevalência das trissomias 13, 18 e 21 na casuística (Tabelas 7 e 8). Em alguns casos, sinais ultra-sonográficos únicos de hidrocefalia ou translucência nuchal aumentada e hérnia diafragmática resultaram em cariótipo com trissomia dos cromossomos 21 e 18, respectivamente. As alterações cromossômicas encontradas (Tabela 8) não estiveram relacionadas com a dimensão e gravidade das malformações fetais.

Antecedentes de malformações congênitas, genéticas e/ou bioquímicas representaram um percentual importante de indicações de cariótipo, aparentemente super estimadas neste trabalho. Estudos feitos em casais com história de aborto recorrente revelaram que 10% deles eram portadores de alterações cromossômicas, sendo 44% destas representadas por translocações; 48% por mosaicismos variados e 8% por deleções e inversões (Singh et al., 1980; Andrews et al., 1982; Sachs, et al., 1985). Estas alterações podem ocorrer por erros na segregação durante a meiose, acarretando um complemento cromossômico anormal nos gametas; o risco de transmissão é variável e depende de uma combinação de fatores, tais como o sexo do genitor transmissor, o desequilíbrio de gametas potencialmente viáveis, o cromossomo envolvido, a dimensão da anomalia cromossômica e o tipo de segregação gamética (Gardner e Sutherland, 1989).

Um estudo colaborativo europeu sobre antecedentes de cromossomopatias revelou que translocações balanceadas parentais resultaram em fetos portadores de inversão cromossômica em 5,9% dos casos; translocações recíprocas originaram 11,8% de fetos alterados (Boué e Gallano, 1984); história de criança prévia com alteração cromossômica, contribuíram com recorrência de 1,42% nas gestações subseqüentes (Stene, et al., 1984). Paralelamente, sabe-se que as alterações cromossômicas são responsáveis por 61% dos abortos em idade gestacional inferior a 12 semanas (Boué, et al., 1975), algumas herdadas de um dos genitores. Em nosso trabalho, os altos percentuais de indicações de cariótipo decorrentes desta situação são decorrentes, na verdade, de um conjunto de situações agrupadas em uma mesma categoria, estando entre elas as malformações de origem idiopática, alterações gênicas e bioquímicas também foram incluídas nesta categoria (Tabela 7).

As trissomias dos cromossomos 18 e 13, respectivamente Síndrome de Edwards e de Patau apresentam, em 80% dos casos, trissomia livre, prevalência do sexo feminino e associação com idade materna avançada (Beiguelman, 1982). Neste trabalho, todos os resultados relatados compreenderam trissomias livres, sendo 50% deles em gestantes com risco para idade avançada. Todavia, a confirmação de prevalência do sexo feminino somente foi verificada na trissomia do 13 (8 femininos: 4 masculinos) (Tabela 8).

Uma característica algumas vezes surpreendente da trissomia 18 é a aparente escassez de sinais ultra-sonográficos sugestivos desta alteração. Na casuística estudada, alteração única de hérnia diafragmática resultou em cariótipo alterado. A hérnia diafragmática é uma anomalia congênita, onde os órgãos abdominais estão em contato com a cavidade torácica, devido a um desenvolvimento anormal do diafragma. Ocorre em aproximadamente 1 em 3000 nascimentos (Bettelheim, et al.; 1998), sua etiologia não está bem esclarecida, mas a literatura cita esta alteração associada a translocações e deleções cromossômicas (Temple, et al., 1994; Bettelheim et al., 1998).

Na trissomia do cromossomo 21, as características mais comuns são as alterações do sistema urinário, em especial a dilatação uni ou bilateral dos sistemas renais coletores, que pode envolver também a dilatação pélvica (Gordon, et al.; 1990). Neste trabalho, alterações renais não constituíram exclusividade, tampouco indicação principal de cariótipo, para os casos de suspeita de síndrome de Down (Tabelas 7 e 8).

A literatura relata que, na Síndrome de Turner, somente 55% das portadoras apresentam monossomia total do cromossomo X; as demais apresentam graus variados de mosaicismos ou alterações estruturais do cromossomo X (De Grouchy e Turleau, 1978; Be et al; 1999). Na casuística deste trabalho, obteve-se 7 casos 45, X e somente 1 caso de mosaicismos 45,X/46,XX, a maioria em gestantes jovens e somente um caso de idade materna superior a 35 anos. Esses dados corroboram que a Síndrome de Turner é uma das poucas anomalias cromossômicas numéricas com prevalência em mulheres jovens.

As triploidias fetais são, na maioria dos casos, originárias de dispermia. Os casos de origem materna são originados principalmente por erros na meiose II (Zaragoza et al., 2000). Fetos triploides com conjunto cromossômico extra de origem paterna apresentam placentas anormais, classificadas como molas hidatiformes parciais (Thompson & Thompson, 1993). Neste estudo houve um caso de complemento 69,XXX com mola hidatiforme, porém em confirmação citogenética da origem parental.

As alterações cromossômicas vêm acompanhadas de fenótipos característicos. A literatura descreve várias alterações detectadas ao exame ultra-sonográfico, associadas a fatores genéticos. As mais frequentes são as malformações de fechamento de tubo neural, principalmente anencefalia, encefalocele e meningomielocoele. Embora de causa desconhecida, fatores genéticos estão provavelmente implicados, pois o risco de recorrência entre irmãos de indivíduos afetados é 10 a 20 vezes maior que em indivíduos sem história da anomalia na família (Suthers e Haan, 1997). Neste trabalho, as alterações de fechamento de tubo neural, contribuíram com 16% de alterações cromossômicas.

As malformações de parede abdominal, como onfalocele e gastrosquise também representam defeitos comuns associados a fatores genéticos. A onfalocele é um prolapso intra-abdominal da base do cordão umbilical, revestida por uma membrana de peritônio e âmnio; tem prevalência de 1, em cada 4000 nascidos vivos (Baird e MacDonald, 1981; Bair et al., 1986). É um marcador ecográfico comum nas trissomias do cromossomo 18 (Nicolaidis et al., 1993) e tem maior incidência em idade materna avançada (Martin, 1998). Esse fato não foi confirmado neste trabalho, onde a idade das gestantes com fetos acometidos estava entre 17 e 29 anos, exceto em duas gestantes com idade materna superior a 35 anos. Neste grupo, um feto apresentou trissomia do cromossomo 13, uma trissomia 21 e uma alteração estrutural.

A gastrosquise ocorre em 1 a cada 30.000 nascidos vivos e, segundo a literatura, é mais freqüente em gestantes jovens (Calzolari et al., 1995). Nesta casuística, os poucos casos de gastrosquise ocorreram em gestantes com idade entre 17 e 23 anos, porém não foram acompanhados de alteração cromossômica.

Nas indicações de cardiopatia, foram observados cinco fetos (29%) com alterações cromossômicas. Schwanitz et al. (1990), analisaram 102 fetos com cardiopatias, cuja incidência de alterações cromossômicas foi de 40%. Os resultados obtidos reforçam a indicação de cariótipo em fetos nos casos de cardiopatias, principalmente nas estruturais.

Aumento da espessura da prega nuchal, no primeiro trimestre de gravidez, e especialmente na 12ª semana de gestação, é considerado um marcador de aneuploidia fetal (Pajkrt et al., 1998; Acácio et al., 2001; Panburana et al., 2001). Os resultados aparentemente subestimados obtidos nesta casuística (13% de alterações cromossômicas) devem refletir, provavelmente, medições ecográficas e encaminhamentos realizados em ocasiões não recomendadas para a utilização deste marcador, denotando portanto valores superestimados desta, em gestações normais.

A hidropsia fetal é uma síndrome associada com ascite, derrame pleural ou pericárdico e edema subcutâneo generalizado. Pode ser observada no segundo trimestre de gestação e, freqüentemente, está associada com higroma cístico na síndrome de Turner (Trent, 1997). Encontramos, neste trabalho, 3 fetos com hidropsia e trissomia do cromossomo 21 e 3 fetos com monossomia X.

Nas indicações de higroma cístico, 25% dos fetos apresentavam cromossomopatia, reforçando a utilização deste como marcador de aneuploidias. Enfermidades monogênicas, como as síndromes de Noonan e Roberts (Nyberg et al., 1993; Chery et al., 1993; Carrasquero et al., 1998), cursam também com higroma cístico.

Restrição no crescimento intra-uterino é sinal sugestivo de cromossomopatia. Snijders e colaboradores, (1993), estudando 458 fetos nesta condição, constataram que as alterações mais comuns eram as triploidias e trissomias 18. A casuística estudada indicou quatro casos de aneuploidias em onze de restrição no crescimento intra uterino, confirmando a necessidade de cariótipo nos fetos com crescimento comprometido, mesmo como sinal isolado.

Considerando as características da população atendida e a abrangência do serviço de Medicina Fetal sobre as demais áreas de um hospital de referência, os resultados evidenciam a participação fundamental do laboratório de citogenética como parte do atendimento integral à saúde materno-infantil e sobretudo à exequibilidade de um projeto que priorize a qualidade de atendimento à população e a prevenção de doenças de origem genética nos sistemas de saúde pública. A implantação do programa de Medicina Fetal poderia, a médio e a longo prazo, gerar procedimentos mais efetivos na captação precoce das gestantes de alto risco, bem como oferecer medidas terapêuticas eficazes, e igualmente precoces, compatíveis com as características da população atendida.



CONCLUSÕES

- Na população estudada, 84% dos encaminhamentos com indicação de cariótipo ocorreram após a 20ª semana de gestação, restringindo as possibilidades diagnósticas e terapêuticas efetivas nas gestações de risco para malformações e/ou disfunções fetais, associadas ou não a alterações cromossômicas.
- Na população estudada, 3% corresponderam a gestações a pré-termo com indicação de cariótipo. Destas, 33% apresentaram alterações cromossômicas detectadas tardiamente.
- 50% das alterações cromossômicas fetais foram encontradas em gestantes jovens, denotando a necessidade do diagnóstico citogenético também para estas situações.
- As indicações que representam maiores riscos para alterações cromossômicas foram as cardiopatias, idade materna avançada, restrição de crescimento intra-uterino, higroma cístico e cisto de Dandy-Walker.
- Considerando os dados de literatura acerca da associação entre idade materna avançada e aneuploidias, os resultados obtidos confirmaram a razão de prevalência aumentada a partir de 36 anos e a necessidade de inclusão deste limite como fator de risco e indicação de cariótipo.
- Considerando a idade gestacional das mulheres atendidas e as implicações econômicas envolvidas em exames complexos, a análise citogenética através de punção de cordão umbilical pode ser a alternativa exequível em hospitais da rede terciária que prestam atendimento à população com características semelhantes às referidas neste trabalho.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACACIO, G.L.; BARINI, R.; PINTO JUNIOR, W.; XIMENES, R.L. PETTERSEN, H.; FARIA, M. Nuchal translucency an ultrasound marker for fetal chromosomal abnormalities. **São Paulo Med. J.** 119: 19-23, 2001.
- ALLAN, B.B.; BRANT, R.; SEIDEL, J.E.; et al. Declining sex ratios in Canada. **CMAJ** 156: 37-41, 1997.
- ANDREWS, T.; ROBERTS, D.F. Chromosome analyses in couples with repeated pregnancy loss. **J. Biosoc. Sci** 14: 33-38, 1982.
- ARNOLD, F.; RUTSTEIN, S.; et al. Sex ratio unaffected by parental age gap. (letters). **Nature** 390: 242-243, 1997.
- ASHWOOD, E. R.; CHENG, E.; LUTHY, D.A. maternal serum alpha-fetoprotein and fetal trisomy 21 in women 35 years and older: implications for alpha-fetoprotein screening programs. **Am. J. Med. Genet.** 26: 531-539, 1987.
- BAIRD, P.A.; MACDONALD, E. C. An epidemiologic study of congenital malformations of the anterior abdominal wall in more than half a million consecutive births. **Am. J. Hum. Genet.** 33: 470-478, 1981.
- BAIR, J.H.; RUSS, P.D.; PRETORIUS, D.H.; MANCHESTER, D.; MANCO-JOHNSON, M.L. Fetal omphalocele and gastroschisis: A review of 24 cases. **AJR** 147: 1047-1051, 1986.
- BARINI, R; STELLA, J.H; RIBEIRO, S.T; LUIZ, F.B; ISFER, E.V; SANCHES, R.C; FAÚNDES, A; SILVA, J.L.P.. Desempenho da ultra-sonografia pré-natal no diagnóstico de cromossomopatias fetais em serviço terciário. **Rev. Bras. Ginec. Obst.** 24: 121-127, 2002.
- BE, C.; VELÁSQUEZ, P.; YOULTON, R.. Spontaneous abortion: cytogenetic study of 609 cases. **Rev. Med. Chile** 125: 317-322, 1997.
- BE, C.; VELÁSQUEZ, P.; YOULTON, R.. Laboratorio de citogenética: Experiencia de 15 años. **Rev. Med. Clínica las Condes** 10: 24-27, 1999.
- BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. In: **_ As cromossomopatias autossômicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982, 179-215.

- BELMONTE, P. L.; SFENDRYCH, R.R.; SANCHES, R.C.; ISFER, E.V. Ultrasonografia obstétrica morfológica. **Rev. Méd. Gin. Obstet.** 7: 328-36, 1996.
- BENKHALIFA, M.; MENEZO, Y.; JANNY, L.; POLY, J.L.; QUMSIYEH, M. B Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. **J. Assisted Repr. Genet.** 13: 140-148, 1996.
- BETTELHEIM, D.; DRAHONSKY, R.; EPEL, W.; BERNASCHEK, G.. Two cases of prenatally diagnosed diafragmatic hernia accompanied by the same undescribed chromosomal deletion (15q24 de novo). **Clin. Genet.** 53: 319-320, 1998.
- BEVIS, D. C. A. The antenatal prediction of hemolytic disease of the newborn. **Lancet I**: 395-401, 1952.
- BOUÉ, J.; BOUÉ, A.; LAZAR, P.. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. **Teratology** 12: 11-26, 1975.
- BOUÉ, J.; BOUÉ, A. Genetic counseling and prenatal diagnosis for chromosome anomalies. Use of study of spontaneous abortions. **Int. J. Gynaecol. Obstet.** 14: 290-295, 1976.
- BOUÉ, A.; GALLANO, P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. **Prenat. Diag.** 4: 45-68, 1984.
- BORGART, M.H; PANADIAN, M.R.; JONES, W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. **Prenat. Diag.** 7: 623-630, 1987.
- BOTTCHEER-LUIZ, F.A. **Seleção sexual *in vitro*, comparação entre os métodos de Percoll e swim-up e proposta de nova técnica.** Tese (doutorado). Faculdade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- BRIZOT, M.L.; CHIBA, C.H.; ZUGAIB, M. **Rastreamento bioquímico de malformações estruturais e cromossomopatias** . In: ZUGAIB, MARCELO; PEDREIRA, D.A.L.; BRIZOT, M.L.; BUNDUKI, V. **Medicina fetal.** São Paulo: Editora Atheneu, 2º ed. 1997, p-601-621.

- BROMEN, K.; JOCKEL, K.H. Change in male proportion among newborn infants. (letter). **Lancet**, **349**: 804-806, 1997.
- CALZOLARI, E.; BIANCHI, F.; DOLK, H. Onphalocele and gastroschisis in Europe: A survey of 3 million births, 1980-1990. **Am. J. Med. Genet.** **58**: 187-194, 1995.
- CARNICK, J.A.; KNIGH, G.J.; PALOMAKI, G.E.; HADDOW, J.E.; CUCKLE, H.S.; WALD, N.J. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancy with Down's syndrome. **Br. J. Obstet. Gynecol** **95**: 330-333, 1988.
- CARON, L.; TIHY, F.; DALLAIRE, L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analyses in one laboratory. **Am. J. Med. Genet.** **82**: 149-154, 1999.
- CHERY, M.; PHILIPPE, C.; WORMS, A.M.; GILGENKRANTZ, S. The Noonan Syndrome. The Nancy experience revisited. **Genetic Counseling** **4**: 113-118, 1993.
- COMPTON, A. A.; KIRKISH, L.S.; PARRA, J.; STOECKLEIN, S.; BARCLAY, M. L.; MCCANN, D.S. Diurnal variations in unconjugated and total plasma estriol levels in late normal pregnancy. **Obstet. Gynecol.** **53**: 623-626, 1979.
- CRANDALL, B.F.; ROBINSON, L.; GRAU, P. Risks associated with an elevated maternal serum α -fetoprotein level. **Am. J. Obstet Gynecol.** **49**: 581-586, 1991.
- CRANDALL, B.F.; LEBHERTZ, R.B.; SCHROTH, P.C.; MATSUMOTO, M. Alpha-fetoprotein concentrations in maternal serum: relation to race and body weight. **Clin. chem.** **20**: 531-533, 1983.
- CUCKLE, H.S.; WALD, N.J.; LINDEMBAUM, R.H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: A screening test for Down syndrome. **Lancet** **I**: 926-929, 1984.
- DAVIS, D.L.; GOTTLIEB, M.B.; STAMPNITZKY, J.R. Reduced ratio of male to female births in several industrial countries: a sentinel health indicator? **JAMA** **279**: 1018-1023, 1998.
- DORAN, T.A.; CADESKY, K.; WONG, P.Y.; MASTROGIACOMO, C.; CAPELLO, T.. Maternal serum alpha-fetoprotein and fetal autosomal trisomies. **Am. J. Obstet Gynecol** **154**: 277-281, 1986.

FORD, K.L.; VERJAL, R.S.L.; WILLIAMS, D.W. amniotic fluid culture failure. *N. Engl. J. Med.* **296**: 286-289, 1973.

GITLIN, D.; PERRICELLI, A.; GITLIN, G.M. Synthesis of alpha-fetoprotein by liver, yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res* **32**: 979-982, 1972.

GITLIN, D. Normal biology of alpha-fetoprotein. *Ann NY Acad Sci* **259**: 7-16, 1975.

GORDON, E.D.; FERRA, M.C. Registro, incidencia y diagnóstico prenatal de las malformaciones congénitas mayores más severas. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* **15**: 403-408, 1999.

GORDON, A.Q.C.; THOMAS, D.F.M.; ARTHUR, R.J.; IRVING, H.C.; SMITH, S.E.W.. Prenatally diagnosed reflux: A follow-up study. *British J. Urol.* **65**: 407-412, 1990.

GROUCHY, J. DE E TURLEAU, C.. Atlas de las enfermedades cromossômicas. Editorial Marin S. A. Barcelona 356p. (1978) Apud. BEIGUELMAN, B. *Citogenética humana*; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p. 328.

HABIB, A. Maternal serum alpha-fetoprotein: its value in antenatal diagnosis of genetic disease and in obstetrical-gynecological care. *Acta Obst. Gynecol. Scand.* (Suppl. 61): 14-18, 1977.

HEREDERO, B.L. Los Serviços de genética médica en Cuba. *Bras. J. Genetics* **20** (supl): 47-54, 1997.

HOLZGREVE, W.; MINY, P.; GERLACH, B.; WESTENDORP, A.; AHLERT, D.; AND HORST, J. Benefits of placental biopsies for rapid karyotyping in the second and third trimesters (late chorionic villus sampling) in high risk pregnancies. *Am. J. Obst. Gynecol.* **162**: 1188-92, 1990.

HOOK, E. B. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstet. Gynecol.* **58**: 282-5, 1981.

HSU, L.Y.F. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Genetic disorders and the fetus, cap. 5*: 115-172, 1986.

- HSU, L.Y.F.; KAFFE, S.; JENKINS, E. C.; ALONSO, L. Y. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. **Prenat. Diagn.** **12**: 555-561, 1992.
- HUDSON, P.; JOHN, M.; CRAWFORD, R.; HARALAMBIDIS, J.; SCANLON, D.; GORMAN, J.; TREGGAR, G.; SHINE, J.; NIAL, H. Relaxin gene expression in human ovaries, the predicted structure of the human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. **EMBO J.** **3**: 2333-2339, 1984.
- HUISJES, H.J. Evaluation of amniotic fluid. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **106**: 1222-1236, 1970.
- HULTEN, M.A.; GOOULD, C.P.; GOLDMAN, A.S.H.; WATERS, J.J. Chromosome in situ suppression hybridization in clinical cytogenetics, **Journal of Medical Genetics** **28**: 577-582, 1991.
- ILLINGWORTH, P.J.; REEDDI, K.; SMITH, K.; BAIRD, D.T. Pharmacological "rescue" of the corpus luteum results in increased inhibin production. **Clin Endocrinol** **33**: 323-332, 1990.
- ISCN. An International System for human cytogenetic Nomenclature. Felix Mitelman (ed). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Published in collaboration with Cytogenetics and Cell Genetics; Basel, Karger, 1995.
- KARCHMER, S. ¿Adónde nos llevará la genética en el diagnóstico prenatal?. **Progr. Diagn. prenatal.** **10**:136-146, 1998.
- LAM, Y.H.; TANG, M.H.Y.; SIN, S.Y.; GHOSH, A. Clinical significance of amniotic-fluid-cell culture failure. **Prenat. Diagn.** **18**: 343-347, 1998.
- LIND, T.; PARKIN, F.M.; CHEYNE, G.A. Biochemical and cytological changes in liquor amnii with advancing gestation. **J. Obstet. Gynecol. Brit.** **76**: 673-675, 1969.
- LINDENBAUM, R.H.; RYNANEN, M.; HOLMES-SIEDLE, M.; PUHAKAINEN, E.; JONASSON, J. KEENAN J. Trisomy 18 and maternal serum and amniotic fluid alpha-fetoprotein. **Prenat. Diagn.** **7**: 511-519, 1987.

LITTLE, J. Epidemiology and control of neural tube defect. **Journal Epidemiology and Community Health** 36: 851-853, 1992.

MANDRUZZATO GP; FISCHER-TAMARO L; DE SETA F D; DOTTAVIO G. Does amniotic fluid alpha-fetoprotein have diagnostic or prognostic value at the time of second midtrimester genetic amniocentesis? **Fetal Diagn. Ther.**, 17: 147-52, 2001.

MANNING, J.T.; ANDERSON, R.H.; SHUTT, M. Parental age skews child sex ratio. **Nature** 389: 344, 1997.

MARNIE, L.; MACDONALD, M.S.; ROSEANNA, M.; WAGNER, B.S.; SLOTNICK, R. N. Sensitivity and specificity of screening for Down syndrome with alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol, and maternal age. **Obstet. Gynecol.** 1: 63-68, 1991.

MARTIN, R.W. Screening for fetal abdominal wall defects. **Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.** 25: 517-526, 1998.

MERKATZ, I.R.; NITOWSKY, H.M.; MACRI, J.N.; JOHNSON, W.E. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 48: 886-894, 1984.

MILUNSKY, A.; JICK, S.S.; BRUELL, C.L.; MACLAUGHLIN, D. S.; TSUNG, Y.; HERSHEL, J.; ROTHMAN K.J.; WILLETT, W. Predictive values, relative risks and overall benefits of high and low maternal serum α -fetoprotein screening in singleton pregnancies: new epidemiologic data. **Am. J. Obstet Gynecol** 8: 291-296, 1989.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Gestação de Alto risco. Área técnica da Saúde da Mulher*, 3 ed. Secretaria de Políticas da Saúde, Brasília, 2000, 164pp.

MOLLER, H. Change in the male: female ratio among newborn infants in Denmark. (letter). **Lancet.** 348: 828-829, 1996.

MONTEIRO C.A; FRANÇA JÚNIOR I; CONDE, W.L. Evolução da assistência materno-infantil na cidade de São Paulo (1983-1996). **Revista de Saúde Pública**, 34 (supl.): 1-12, 2000.

MONTENEGRO, C.A.B.; RESENDE, J.F. *Medicina Fetal-Atlas comentado*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. P 51, 1998.

- MUNNÉ, S.; GRIFO, J.; COHEN, J.; WEIER, H.U.G. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple probe FISH study. **Am. J. Hum. Genet.** **55**: 150-159, 1994.
- MUNOZ, J.A.; LITTLE, G.A. Screening for Down syndrome using maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated estriol and hCG. **J. Clin. Immunoassay** **12**: 18-25, 1999.
- NYBERG, D.A.; KRAMER, D.; RESTA, R.G.; KAPUR, R.; MAHONY, B. S.; LUTHY, D.A.; HICKOK, D. Prenatal sonographic findings 18: Review of 47 cases. **J. Ultrasound Med** **2**: 103-113, 1993.
- NICOLAIDES, K.; SHAWWA, L.; BRIZOT, M.; SNIJDERS, R.; Ultrasonographically detected markers of fetal chromosomal defects. **Ultrasound Obstet. Gynaecol.** **3**: 56-69, 1993.
- NICOLAIDES, K.; BRIZOT, M.L.; PATEL, F.; SNIJDERS, R. Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks gestation . **Lancet.** **344**: 435-439, 1994.
- NIKKILÄ A; VALENTIN L; THELIN A; JÖRGENSEN C (2002). Early amniocentesis and congenital foot deformities. . **Fetal Diagn. Ther.**, **17**: 129-132, 2002.
- PAJKRT, E.; MOL, B.W.J.; VAN LITH, J.M.M.; BLEKER, O.P.; BILARDO, C.M. Screening for Down's syndrome by fetal nuchal translucency measurement in a high-risk population. **Ultrasound Obstet. Gynecol.** **12**: 156-162, 1998.
- PANBURANA, P.; AJIIMAKOM, S.; TUNGKAIWANGOON, P. First trimester Down syndrome screening by nuchal translucency in a thai population. **Int. J. Gynaecol. Obstet.** **75**: 311-312, 2001.
- PEIXOTO, S. Pré-Natal. In: **Vitalidade e maturidade fetal**. Antonio Guilherme M. porto. São Paulo. Editora Manole. P. 126, 1991.
- PEREIRA, R.W; STURZENNEKER R.; PENA, D.J. Screening fetal losses for monosomy X with a simple PCR-based procedure. **Genet. Mol. Biol.** **23**: 11-14, 2000.
- PENCHASZDEH, V.B. Genetica y salud publica. **Bol. Org. Pan. Salud.** **115**: 1-11, 1993.

PENCHASZDEH, V.B.; BEIGUELMAN, B. Serviços de genética médica da América Latina: Estado atual e perspectivas. **Brás. J. Genetics** 20(sup): 3, 1997.

PRIETO-CARRASQUERO, M.; MOLERO, A. CARRASQUERO, N.; VILLAR, D.A.; FERRER, S.G.; ROJAS, A.; BRITO, J.; MENA, R.; GONZÁLEZ, F.P.; ALVAREZ, F.; QUINTERO, M.; FULCADO, W. Diagnóstico prenatal II: Importância de los marcadores ecográficos em el diagnóstico prenatal de cromosomopatías. **Invest. Clín.** 39: 257-272, 1998.

REECE, E.A. Early and midtrimester genetic amniocenteses, safety and outcomes. **Obstet. gynecol. Clin. N. Am.** 24 : 71-81, 1997.

REID, R.; SEPULVEDA, W.; KYLE, P.M.; DAVIES, G. Amniotic fluid culture failure; clinical significance and association with aneuploidy. **Obstet. Gynecol.** 87: 588-592, 1996.

SACHS, E.S.; JAHODA, M.G.J.; VAN HEMEL, J.O.; HOOGEBOOM, A.J.M.; SANDKUYL, L.A. Chromosome studies of 500 couples with two or more abortions. **Obstet. Gynecol.** 65: 375-378, 1985.

SANCHES, O.; ESCOBAR, J.J.; YUNIS, J. A simples G-banding technique. **Lancet** 269: 521-523, 1973.

SCHNEIDER, E.L. Mycoplasma contamination of cultured amniotic fluid cell. Potential hazard to prenatal chromosome diagnosis. **Science** 184: 477, 1975.

SCHWANITZ, G.; ZERRES, K.; GEMBRUCH, U.; BALD, R.; GAMERDINGER, F.; HANSMANN, M. Prenatal detection of heart defects as an indication for chromosome analysis. **Am. Genet.** 33: 79-83, 1990.

SFENDRYCH, R.R.; BELMONTE, P. L.; ISFER, E. V. Medicina fetal: importância no acompanhamento pré-natal. **RBM-GO** 5: 255-264, 1996.

SINGH, D.N.; HARA, S.; FOSTER, H.W. Reproductive performance in women with sex chromosome mosaicism. **Obstet. Gynecol.** 55: 608-617, 1980.

SIMPSON, J.L. Incidence and timing of pregnancy losses: Relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis. **Am. J. Med. Genet.** 35: 165-73, 1990.

SMITH, A. **Citogenética e diagnóstico pré-natal**. In: TRENT, J.T. Manual de diagnóstico pré-natal. Tradução e revisão científica Dra. Carla Finger. Revisão Marilda Ivanov. São Paulo: Livraria editora Santos, 1997, Bibliografia: pp. 80-109.

SNIJDERS, R.J.M.; SHERROD, C.; GOSDEN, C. M.; NICOLAIDES, K.H. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **168**: 547-555, 1993.

STENE, J.; STENE, E.; MIKKELSEN, M. Risk for chromosome abnormality in amniocentesis. *Prenat. Diagn.* **4**: 81-89, 1984.

STEELE, M.; BREG, W. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* **135**: 383-389, 1966.

SUTHERS, G.; HAAN, E. **Triagem do soro materno e diagnóstico pré-natal de malformações congênitas**. In: TRENT, J.T. Manual de diagnóstico pré-natal. São Paulo: Livraria editora Santos, 1997. Bibliografia: pp. 4-27.

TABOR, A.; MADSEN, M.; OBEL, E.B.; PHILIP, J.; PEDERSEN, B.N. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low risk women. *Lancet* **8**: 1287-1293, 1986.

TEMPLE, I.K.; BARBER, J.C.K.; JAMES, R.S.; BURGER, D. *J. Med. Genet.* **31**: 735-737, 1994.

THOMPSON M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Genética médica. In: **Citogenética clínica: princípios gerais e anormalidades autossômicas**. Revisor técnico. Paulo Armando Mota. Tradutor. Marcio Moacyr de Vasconcelos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993. pp. 138-157.

TÓTH, T.; FINDLAY, I.; PAPP, Z.; TOTH-PAL, E.; MARTON, T.; NAGY, B.; QUIRKE, P.; PAPP, C. Prenatal detection of trissomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J. Med. Genet.* **35**: 126-129, 1998.

TRENT, J.R. Manual de Diagnóstico Pré-Natal. In: **Papel do exame ultra-sonográfico no diagnóstico pré-natal**. David A.Ellwood. São Paulo. Editora Santos, p. 51, 1997.

TUCHINSKY, D.; HOBEL, C.J. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. Early normal pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **117**:884-893, 1973.

VAN DEN BROEK, J.M. Change in male proportion among newborn infants. (letter). **Lancet.** **389**: 344, 1997.

VAN DER PAL-BUIN, K.M.; VERLOOVE-VANHORICK, S.P.; ROELEVELD, N. Change in male:female ratio among newborn babies in Netherlands (letter). **Lancet** **349**: 62, 1997.

VERNA, L.; MACDONALD, F.; LEEDHAM, P.; MCCONACHIE, M.; DHANJAL, S.; HULTÉN, M. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. **Lancet** **352**: 9-12, 1998.

VIEIRA NETO, E.; ZINGONI, L.F.; FONSECA, A.A. Triploidia fetal associada à diminuição da subunidade β e do estriol não conjugado no soro materno. **Rev. Bras.Ginec. Obst.** **21**: 235-238, 1999.

WALD, N.J.; CUCKLE, H.S.; DENSEM, J.W. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. **Br. Med. J.** **297**: 883-887, 1988.

WATANABE, H.; HAMADA, H.; YAMADA, N.; OGURA, T.; YASUOKA, M.O.; OKUNO, S.; FUJIKI, Y.; SOHDA, S.; KUBO, T. Second-trimester maternal pregnancy associated plasma protein A and inhibin A levels in fetal trisomies. **Fetal diagnosis and Therapy** **17**: 137-141, 2002.

ZARAGOZA, M.V.; SURTI, U.; REDLINE, R.W.; MILLIE, E.; CHAKRAVARTI, A.; HASSOLD, T.J. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortion: predominance of diandry and association with the partial hydatiform mole. **Am. J. Hum. Genet.** **66**: 1807-1820, 2000.

Bibliografia realizada segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). 2000.



ANEXO

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO SOBRE PROCEDIMENTOS
INVASIVOS EM MEDICINA FETAL**

Eu, _____, fui
informada sobre

Os problemas que envolvem a saúde de meu bebê. Fui esclarecida de que, para
melhor estudar o problema do meu feto é necessário a realização de uma punção para
coletar _____ (líquido amniótico, sangue fetal, etc...)

E programar o tratamento ou confirmar o diagnóstico do problema. Fui também
esclarecida de que esses procedimentos apresentam riscos como o aparecimento de
contrações (trabalho de parto prematuro), rompimento de bolsa das águas ou sangramento
pelo cordão, situações que podem comprometer a saúde do meu feto. Entretanto fui
informada que essas situações acontecem muito raramente e que esse procedimento é
necessário para oferecer a melhor avaliação do meu caso. Caso eu recuse a realização de
qualquer procedimento, isso não implicará em alteração no meu acompanhamento de pré-
natal.

Paciente _____

Médico _____

Data: ____ / ____ / ____

HIV: _____

TS: _____