



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências da Saúde

Técnicas não invasivas na deteção de cromossomopatias fetais no CHCB no período de 2008-2011

Anay Peñafuerte Diaz

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador
Dr.^a Nélia Rodrigues Pereira

Co-orientador
Dr.^a Fernanda Pereto Meyer

Covilhã, Maio de 2012

Título

Técnicas não invasivas na deteção de cromossomopatias fetais no CHCB no período de 2008-2011.

Autor

Anay Peñafuerte Diaz

a28186@fcsaude.ubi.pt

Natureza

Trabalho de investigação realizado no âmbito de cumprimentos dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Orientador

Dr.^a Nélia Rodrigues Pereira

Médica Especialista em Ginecologia e Obstetrícia

Assistente no Centro Hospitalar Cova da Beira

Co-Orientador

Dr.^a Fernanda Pereto Meyer

Médica Especialista em Ginecologia e Obstetrícia

Assistente no Centro Hospitalar Cova da Beira

Data

Covilhã, Maio de 2012

Agradecimentos

Acima de tudo, a Deus, pela força e coragem que me deu durante esta longa caminhada. O que seria de mim se não tivesse fé Nele? Muito obrigada, Senhor, por estar junto a mim.

À Universidade da Beira Interior e à Faculdade de Ciências da Saúde, por toda a formação durante este ano.

Ao Exmo. Sr. Magnífico Reitor da UBI, Prof. Dr. João A. Queirós, que me deu a possibilidade de estudar neste excelente estabelecimento de Ensino Superior, quando as esperanças se desvaneciam de poder concluir o curso de Medicina.

Ao Dr. Miguel Castelo Branco, Diretor do Curso de Medicina, por dispensar o seu precioso tempo, compreensão e apoio incondicional em tudo aquilo que precisei.

À minha orientadora, Dr.^a Nélia Pereira, por ter acedido ao meu convite e lançado o desafio deste tema, assim como pela calma e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dr.^a Fernanda Pereto Meyer, pela sua honrosa presença nesta investigação.

Ao Prof. Miguel Freitas, que desde o primeiro momento em que lhe pedi ajuda sempre esteve presente, dando o melhor de si com gentileza e boa disposição. E à Dr.^a Filipa Rodrigues, que dedicou horas do seu descanso para me apoiar. Muito obrigada pelo vosso precioso tempo, esforço, paciência e considerações que me ajudaram à execução deste trabalho.

A todos os meus professores, que ao longo do meu percurso me ensinaram e mostraram o quanto estudar é bom.

Ao Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do CHCB, em especial, ao Dr. Carlos Gomes e ao Dr. Moutinho, pela sua disponibilidade, solidariedade, amizade e sugestões, cujas ideias e conhecimentos contribuíram para o enriquecimento desta investigação. E à enfermeira Helena Belo pela sua ajuda e gentileza na recolha dos dados.

Faço questão de deixar também o meu agradecimento aos funcionários do Hospital e dos Serviços Académicos da UBI, principalmente à Sr.^a Helena Gonçalves, pela forma como sempre me receberam e ajudaram em tudo aquilo que precisei. Muito obrigada ao GEEM da Faculdade de Ciências da Saúde, à Dr.^a Manuela Afonso e à Dr.^a Patrícia Barata, pelas suas orientações, solidariedade e ajuda.

À minha família, a quem deixo poucas palavras, mas que são as mais valiosas. Obrigada por vocês existirem. Ao meu pai, meu primeiro mestre, à minha mãe, que sempre acreditou em mim e me ajudou, inclusive orando, além da força e coragem que sempre me transmitiu. O meu sincero agradecimento por me terem trazido à vida e me transmitirem todos os vossos princípios.

Ao meu adorável filhinho, que apesar de sofrer com a minha ausência, sempre me deu força para seguir adiante dia após dia.

O meu agradecimento especial ao meu querido companheiro pelo seu incondicional apoio, amor e compreensão, principalmente pela força e incentivo que me deu nos momentos em

que me apeteceu desistir. Muito obrigada por me ajudares a tornar realidade os meus sonhos e fazer-me tão feliz. Amo-te.

À minha tia Maritza, por me ter ajudado sempre que precisei. Obrigada por me brindares com a tua proteção desde que cheguei a Portugal.

À minha querida irmã Cláudia Ania, pelo seu amor, colaboração e força, assim como todo o apoio financeiro que sempre disponibilizou.

À minha pequena irmã Leidita, tão longe de mim, mas sempre no meu coração, que me confortou com palavras de coragem e alento.

Aos meus queridos amigos, Tomé e Magdalena, Avelino Farias, Umberto, Irina e família, Idalmis e Victor, Toirac e Marta, por toda a vossa ajuda. Estarão sempre presentes no meu coração!

À minha querida Normita, pelas tuas orações, amor e palavras que me encheram de coragem e segurança.

À minha querida Irina, estudante de Medicina nesta faculdade, pela tua amizade, apoio, carinho, companhia e alento.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, obrigada!

Valeu a pena a distância, todo o sofrimento e renúncias...Valeu a pena esperar... Hoje posso colher os frutos do meu e do vosso empenho.

Resumo

Introdução: O Diagnóstico Pré-natal (DPN) oferece um conjunto de técnicas capazes de detetar anomalias congénitas fetais, com uma taxa de deteção superior a 90% e uma Taxa de Falsos Positivos de 5% para os defeitos congénitos. Entre as técnicas de DPN, os rastreios bioquímicos (RB) e ecográficos (RE) são os métodos de deteção não invasivos mais utilizados, sendo muito significativos (quando revelam risco elevado) para a identificação da população de grávidas (grupo de alto risco) a quem se deve aplicar as técnicas de estudo invasivo de DPN, por terem uma maior precisão diagnóstica, tais como: a amniocentese (AMN), a biopsia das vilosidades coriais e a cordocentese. Os protocolos atuais para as mulheres grávidas consideradas em situação de alto risco (de acordo com os critérios standard: idade materna superior a 35 anos e/ou história familiar de doenças genéticas) não permitem a deteção de 80% dos casos de recém nascidos com trissomia 21 e 95% com defeitos no tubo neural em grávidas com menos de 35 anos e sem história de doenças genéticas, a quem a AMN não foi aplicada. Foram estas razões que serviram de base para a realização da presente investigação, a qual foi sustentada com dados do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB).

Objetivos: Avaliar o valor das técnicas não invasivas (RB e RE) na deteção de cromossomopatias fetais (CF), assim como determinar a população de risco que deve ser submetida à confirmação diagnóstica por amniocentese no CHCB.

Métodos: Estudo transversal retrospectivo e documental, tendo por base o registo de 300 mulheres grávidas sem história familiar de doenças genéticas cuja gravidez foi seguida no CHCB. A informação foi recolhida a partir dos processos clínicos das consultas de DPN do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do CHCB realizadas desde 2008 até 2011.

A amostra foi dividida para estudo de acordo com as diferentes indicações para a realização da amniocentese, cuja dimensão foi escolhida *à priori* por método de amostragem acidental. Para cada paciente registaram-se os dados dos RB, RE e da AMN para estabelecer as correspondentes correlações.

A base de dados e os cálculos foram elaborados no programa Excel 2007.

Considerando a AMN como Goldstandard foram realizados testes de diagnóstico para os RB e RE e para os dois em conjunto (EB), construindo tabelas de contingência para cada grupo etário. Para cada teste (E, B e EB) calcularam-se: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, para cada grupo etário. Além disso, foi realizada uma análise de risco a partir do cálculo das “possibilidades” (odds) e das “possibilidades relativas” (odds-ratios).

Resultados: Nas 46 grávidas com idade inferior a 35 anos, com RE anormal (E+), bioquímico com alto risco (B+) ou ambos anormais (EB+) e sem antecedentes de doença genética,

verificaram-se 3 AMN positivas. Neste grupo etário nos RB com baixo risco (B-) e ecográficos normais (E-) verificou-se uma baixa incidência de CF, com valor de 1 e Sens de 0,67 para ambos, VPN de 0,98 e 0,99 respetivamente.

Dos 218 casos de AMN realizadas a mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, existem 3 aneuploidias com 13 rastreios E e/ou B anormais. Neste grupo etário a incidência de CF é de 1,38%.

No grupo com idade igual ou superior a 35 anos, com RB de baixo risco (B-) não foi identificada nenhuma CF (A+), VPN de 1 e Sens de 1. De outro modo com RE normal (E-) foi baixa a incidência de CF, com valor de 1, VPN de 0,99 e Sens de 0,67.

Por último, os RB e RE realizados em conjunto com resultados normais (EB-) em mulheres com qualquer idade, demonstraram uma frequência de CF (A+) de valor 0, um VPN de 1 e Sens de 1. Realizou-se também a comparação entre o número das AMN positivas e negativas para CF, para os grupos de idades (>35 e <39 anos / >39 anos) das grávidas que tiveram EB+, indicando os “odds” e “odds-ratio”, tendo como referência o grupo de controlo (<35 anos), e verificou-se que o “odds-ratio” é igual a 1,6 e 28,6, respetivamente para cada grupo.

Conclusão: De acordo com os resultados dos RE e RB realizados em conjunto e com os critérios de avaliação para a análise bioquímica, o teste conjunto EB parece ser sensível e específico, capaz de dar orientação para a realização duma técnica de diagnóstico invasivo em todas as gravidezes sem antecedentes de aneuploidias, independentemente da idade materna. Em suma, as grávidas cujos RB e RE são completamente normais (EB-) e sem antecedentes de cromossomopatias não precisam de serem submetidas à posterior realização da AMN, para a confirmação do diagnóstico.

Palavras-chave: Diagnóstico Pré-natal, Técnicas Não Invasivas, Cromossomopatias Fetais, Rastreio Bioquímico, Rastreio Ecográfico, Amniocentese.

Abstract

Introduction: The prenatal diagnostic (PND) offers an array of tests which are able to detect congenic fetal anomalies with a rate of higher than 90% and all congenic defects with a false-positive rate of 5%. The biochemical and ultrasound screening tests are the most non-invasive detection methods used among the PND tests. These tests are very important for the PND (especially when they reveal “positive” results or elevated risk of congenic fetal anomalies) to identify the population of pregnant women (high risk group) who generally have to undergo invasive PND tests with higher diagnostic accuracy such as the amniocentesis, the chorionic villus sampling and the cordocentesis.

The current protocols for pregnant women considered as high risk group (based on the standard criteria such as maternal age of higher than 35 years old and/or family history of genetic diseases) do not allow the detection of 80% of trisomy 21 cases and 95% of neural tube defect cases of newborns from mothers who are younger than 35 years old without family history of genetic diseases and who did not undergo amniocentesis. This is the main motivation for the present research study which is based on the analysis of clinical data obtained from the Hospital Cova da Beira (CHCB).

Objectives: Evaluate the value of non-invasive screening tests (biochemical and ultrasound tests) detecting fetal chromosomopathy as well as select the population of high risk women who have to undergo a confirmatory invasive test of PND such as the amniocentesis.

Methods: Transversal, retrospective and documented study based on the clinical data of 300 pregnant women without family history of genetic diseases who were observed during their pregnancies at the CHCB. The clinical data were collected from medical records of PND consultations of Gynecology and Obstetrics Department of CHCB between 2008 and 2011. The sample, the size of which was previously determined by convenience sampling, was divided according to different indications for amniocentesis.

For each patient, the clinical results for the biochemical (B), ultrasound (E) and amniocentesis tests were registered to establish the respective correlation studies. The database was created and calculations were made executed with the software MS Excel 2007. The amniocentesis was considered as gold standard and biochemical test (B), ultrasound (E) or both tests (EB) were used to make contingency tables for each age group. For each test (E, B and EB) the following calculations were conducted: sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). In addition, a risk analysis was performed based on the odds and odd-ratios.

Results: Of 46 pregnant women younger than 35 years old with risk factor E+, B+, or both EB+ and without family history of genetic diseases, 3 had positive results in the amniocentesis test. In this age group, the biochemical test with low risk (B-) and normal ultrasound (E-)

revealed low incidence of chromosomopathy, with a value of 1 and sensitivity of 0,67 for both. NPV values were 0,98 and 0,99 respectively. Of 218 cases of amniocentesis performed in 35 years old or older women, 3 were positive for aneuploidies and 13 were positive in the ultrasound (E+) and /or biochemical (B+) screening tests. For this group the incidence of chromosomopathy was 1.38%.

No fetal chromosomopathy (A+) was detected in the group of women with the age of 35 years or older and low risk biochemical test (B-). NPV equal to 1 and sensitivity value equal to 1. On the other hand, normal ultrasound tests (E-) showed low incidence of chromosomopathy and NPV values equal 1, NPV equal 0,99 and sensitivity value equal 0,67.

The frequency of fetal chromosomopathy (A+) was equal 0 in all negative cases for the biochemical and ultrasound tests in all the age groups, with NPV=1 and sensitivity=1.

The results were also compared with the number of amniocentesis (positive and negative for chromosomopathy) for the age groups (>35 and <39 / >39 years old) of women that were EB+. The “odds” and “odds-ratios” were measured for each age group and were compared with the control group which consisted of pregnant women younger than 35 years old. The odd-ratios were equal to 1,6 and 28,6 for each group respectively.

Conclusions: The results of the biochemical and ultrasound screenings performed as a whole, along with the criteria of evaluation for biochemical analysis indicate that non-invasive tests (biochemical and ultrasound) are sensible and specific methods useful to direct the execution of invasive tests in all the cases of pregnant women without family history of aneuploidies regardless the maternal age. In conclusion, pregnant women negative for biochemical and ultrasound screenings and without family history of genetic diseases do not need to undergo amniocentesis for PND's confirmation.

Key words: Prenatal Diagnostic, Non-invasive Tests, Fetal Chromosomopathy, Biochemical Test, Ultrasound Test, Amniocentesis.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Agradecimentos | ii |
| Resumo | iv |
| Abstract | vi |
| Índice de Figuras | ix |
| Índice de Quadros | ix |
| Índice de Gráficos | ix |
| Índice de Tabelas | ix |
| Lista de Acrónimos | x |
| | |
| Introdução | 1 |
| Objetivo principal | 6 |
| Objetivos secundários | 6 |
| Hipóteses experimentais | 6 |
| Materiais e Métodos | 7 |
| Tipo de estudo e população | 7 |
| Métodos estatísticos | 8 |
| Procedimentos para estudos de diagnóstico | 8 |
| Resultados | 9 |
| Discussão | 16 |
| Conclusão | 19 |
| Desafios Futuros | 19 |
| Referências Bibliográficas | 20 |

Índice de Figuras

| | |
|---|---|
| Figura 1 - Procedimento de Amniocentese..... | 2 |
| Figura 2 - Ecografias de fetos com TN Normal e TN Aumentada | 5 |

Índice de Quadros

| | |
|--|---|
| Quadro 1. Distribuição da amostra (N=300) por grupo etário e por critérios para AMN..... | 7 |
| Quadro 2. Definições para os testes de diagnóstico | 8 |
| Quadro 3. Definições para as tabelas de contingência..... | 9 |

Índice de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Medidas de desempenho dos testes (todas as idades) | 14 |
|---|----|

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resultados das AMN, RB e RE, por mulher grávida, segundo a idade | 9 |
| Tabela 2. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade <35 anos (N= 82)..... | 10 |
| Tabela 3. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade <35 anos, com resultados de E e/ou B anormais (N= 46) | 10 |
| Tabela 4. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade \geq 35 anos (N= 218) | 11 |
| Tabela 5. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade \geq 35 anos, com resultados de E e/ou B anormais (N=13) | 11 |
| Tabela 6. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade \geq 39 anos (N= 73)..... | 12 |
| Tabela 7. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade \geq 39 anos, com resultados de E e/ou B anormais (N=3)..... | 12 |
| Tabela 8. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em todas as grávidas da amostra (N= 300)..... | 13 |
| Tabela 9. “Odds” de uma grávida com EB+ ter A+, segundo as idades | 13 |
| Tabela 10. “Odds” de uma grávida com qualquer EB ter A+, segundo as idades..... | 13 |
| Tabela 11. AMN e CF Detetadas..... | 15 |

Lista de Acrónimos

- AC - Anomalias Cromossómicas
- ADN - Ácido Desoxirribonucleico
- AFP - Alfa-feto proteína
- AMN - Amniocentese
- (A+) - Amniocentese com resultado anormal
- (A-) - Amniocentese com resultado normal
- (B+) - Rastreio Bioquímico de Alto Risco
- (B-) - Rastreio Bioquímico de Baixo Risco
- Beta-HCG - Gonadotrofina coriónica humana
- CF - Cromossomopatias Fetais
- CHCB - Centro Hospitalar Cova da Beira
- DPN - Diagnóstico Pré-Natal
- (E+) - Rastreio Ecográfico Anormal
- (E-) - Rastreio Ecográfico Normal
- EB - Rastreio Conjunto (Ecográfico e Bioquímico)
- (EB+) - Rastreio Conjunto Alterado
- (EB-) - Rastreio Conjunto Normal
- (FD) - Fluxometria Doppler
- PAPP-A - Proteína A plasmática associada à gravidez
- RB - Rastreio Bioquímico
- RE - Rastreio Ecográfico
- Sens - Sensibilidade
- TD - Taxa de Deteção
- TN - Translucência da Nuca
- T21 - Trissomia 21
- VPN - Valor Preditivo Negativo
- VPP - Valor Preditivo Positivo

Introdução

Atualmente a ciência consegue aceder as particularidades mais ocultas de uma gravidez, pois pode avaliar o feto nos seus múltiplos aspetos fisiopatológicos. Tanto é que o feto já é considerado um paciente, com seus sinais e sintomas, fundamentais para a avaliação clínica, podendo oferecer medidas de prevenção, assim como o tratamento atempado a todas as mães, especialmente as que apresentam fatores de risco.

A atual investigação baseia-se na análise do risco de ocorrência de cromossomopatias fetais (CF), dado que as anomalias congénitas são a primeira causa de atraso mental e abortos nas grávidas que apresentam clinicamente padrões malformativos congénitos, afetando 1 em cada 150 recém-nascidos vivos(1).

Os cromossomas são as estruturas do núcleo celular, onde se encontra a maioria de ácido desoxirribonucleico (ADN). A espécie humana tem 46 cromossomas, agrupados em 23 pares. Os primeiros 22 pares denominam-se autossomas e os cromossomas do par 23 são os chamados sexuais e estão representados por X e Y. As anomalias cromossómicas (AC) são congénitas ou adquiridas e classificam-se em dois grupos: as numéricas e as estruturais, mantendo o número global de 46. As anomalias numéricas estão subdivididas em poliploidias e aneuploidias. Nas poliploidias as células contêm um ou mais conjuntos de cromossomas extra, múltiplo de 23. Nas aneuploidias existe um número de cromossomas que não é múltiplo do número haploide de cromossomas = 23, este ganho ou perda de cromossomas pode suceder tanto nos autossomas como nos cromossomas sexuais. O ganho de um único cromossoma é o que se chama trissomia (cromossomopatia mais facilmente reconhecível) e a perda de um único cromossoma monossomia(1). A Trissomia 21 (T21) é a aneuploidia mais prevalente afetando cerca de 1/800 nados-vivos(2).

O diagnóstico de uma cromossomopatia associado ao seu risco de ocorrência permite realizar o DPN, sendo este um conjunto de técnicas obstétricas e analíticas, incluindo as genéticas, capaz de detetar anomalias congénitas fetais com uma Taxa de Detecção (TD) de mais do 90% e Taxa de Falsos Positivos de 5% para os defeitos congénitos, sempre que se aplique a técnica adequada no momento certo. O momento ideal para efetuar o DPN é durante as 14-15 semanas de gravidez, altura em que se pode combinar o estudo cromossómico com o doseamento de alfa-feto proteína (AFP)(3).

É fornecido a todas as grávidas um Programa Nacional de Rastreio/Vigilância de anomalias fetais e de patologias associada à gravidez, que compreende: os rastreios ecográficos (RE) de deteção de anomalias morfológicas do feto, os rastreios bioquímicos (RB) de CF, a amniocentese (AMN), o rastreio do estado imunitário (relativo à rubéola, toxoplasmose, sífilis, hepatite B e SIDA), o rastreio dos anticorpos anti-D nas grávidas com o tipo de sangue Rh negativo e o rastreio da diabetes gestacional(3).

Os marcadores ecográficos e bioquímicos contribuem de forma significativa para a identificação da população de grávidas a quem se deve aplicar técnicas de estudo invasivo, as

quais oferecem maior precisão diagnóstica, tais como: a AMN, a biopsia das vilosidades coriônicas e a cordocentese(4).

De todas as técnicas anteriormente referidas, a AMN é aquela que tem maior interesse para o presente estudo por ser um método de rotina de ampla experiência, utilizada em laboratórios de DPN e por possibilitar o estudo citogenético com um período de resposta de 7-14 dias. Contudo, este período pode ser reduzido para 24 horas, mediante a aplicação de técnicas moleculares de DPN como o FISH (Fluorescence in situ Hibridization), que consiste no produto da combinação da citogenética tradicional e da biologia molecular, permitindo que sequências de ADN sejam analisadas diretamente no núcleo ou no cromossoma através de sondas marcadas; possibilitando assim o diagnóstico prévio de trissomias 13, 18 e 21, bem como anomalias de cromossomas sexuais, correspondendo a 97% das CF(3, 5).

A AMN consiste na recolha de uma certa quantidade de líquido amniótico através de uma agulha apropriada, cuja introdução na cavidade amniótica faz-se sob controlo ecográfico contínuo, para confirmar o tempo da gestação e da vitalidade fetal, determinar o número de fetos e de cavidades amnióticas, localizar a placenta e as zonas onde o líquido amniótico é mais abundante, assim como detetar eventuais anomalias fetais. É realizada entre as 15-18 semanas de gravidez e tem uma grande precisão diagnóstica(3, 6, 7).

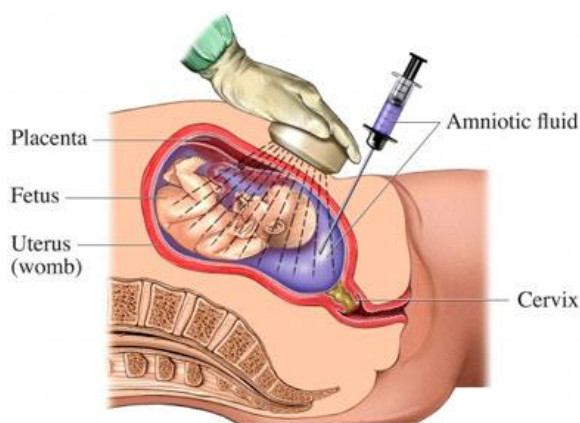


Figura 1 - Procedimento de Amniocentese

Fonte: Nucleus Medical Media Catalog (<http://catalog.nucleusinc.com>)

A AMN foi a primeira técnica invasiva aplicada clinicamente no final da década de 50, primeiramente como método auxiliar para o diagnóstico indireto do grau de anemia fetal nas grávidas isoimunizadas. Só em meados da década de 60 é que passou a ser utilizada na avaliação da maturidade fetal e, mais tarde, no DPN de AC do feto(3). É indicada nas seguintes situações(4):

- Se a grávida tem mais de 34 anos na altura do parto;
- Se o casal teve um filho com defeitos cromossómicos ou malformações;
- Se o casal teve um filho ou parente próximo com defeitos do tubo neural (defeitos da coluna vertebral e cérebro, incluindo espinha bífida e anencefalia);
- AC estrutural de algum progenitor;

- História familiar de doença genética diagnosticada;
- Se é necessário determinar a maturação dos pulmões do bebê;
- Se outros testes, tal como o RB tiver risco aumentado ou o RE identificar alguma anormalidade.

Após a realização da AMN podem surgir complicações tais como: infecções, perdas sanguíneas vaginais e de líquido amniótico, observáveis em cerca de 1%. O risco mais significativo é o aborto (1%) que aumenta até 9% quando a anamnese revela ter havido perdas sanguíneas vaginais durante o 1.º trimestre de gestação(3, 7, 8). No entanto, na AMN realizada antes das 14 semanas (AMN precoce) a taxa de perda fetal é maior do que a executada depois desta data(3, 9). Por outro lado tem a vantagem de poder conhecer os resultados do DPN num momento em que uma eventual interrupção da gravidez envolve menor morbidade materna e é tecnicamente mais fácil(4). Outra questão importante é o custo económico que esta técnica representa, pois é muitas vezes aplicada desnecessariamente.

O DPN combina técnicas ecográficas, citogenéticas e moleculares com a intenção de identificar precocemente os riscos, sendo muito importante a aplicação de procedimentos de diagnóstico não invasivos ou minimamente invasivos. A complexidade, o custo e o risco de algumas destas técnicas estabelecem o caminho a seguir em função da presença ou não de um risco específico de anomalia fetal(9). Entre as técnicas não invasivas de DPN utilizadas no CHCB destacam-se o RB ou screening sérico e o RE(3).

O RB ou screening sérico é realizado para avaliar o risco individual da ocorrência de CF (trissomia 13, 18, 21, X e Y), identificando indivíduos com maior probabilidade de serem afetados(7, 10, 11). Contempla as fases seguintes(3):

- a) RB precoce (realizado aproximadamente nas 10 semanas de gestação) em combinação com o estudo ecográfico nas 12 semanas. Têm maior poder discriminativo, permitindo TD maiores para T21.
- b) RB no 1.º trimestre (entre as 11-13 semanas + 6 dias de gestação). Não faz a deteção de defeitos do tubo neural. Utiliza-se a combinação de(2, 9, 12):
 - PAPP-A (proteína A plasmática associada à gravidez), quando apresenta valores baixos (em cerca de 0,5 MoM) pode ser um indicador de T21.
 - Beta-HCG (gonadotrofina coriônica humana) quando apresenta valores elevados (em cerca de 2 MoM) pode indicar T21.
 - A medida da translucência da nuca (TN) como marcador ecográfico (é considerada aumentada quando está acima do percentil 95): pode ser um indicador de T21.
- c) RB no 2.º trimestre (realizado entre as 14-18 semanas de gestação) que, apesar de ter uma menor TD para T21, permite a deteção dos defeitos do tubo neural, baseando-se na combinação de vários marcadores de aneuploidias(13):
 - AFP (Alfa-feto proteína): quando apresenta valores baixos (em cerca de 0,7 MoM) pode indicar T21 e tubo neural aberto.

- Beta-HCG, pois quando apresenta valores elevados (em cerca de 2 MoM) pode indicar T21.

O RB não proporciona um diagnóstico definitivo, mas identifica grupos de alto risco, com probabilidade de padecerem de alguma cromossomopatia quando apresentam resultado de risco elevado(14). Além disso, identifica a suscetibilidade individual da gestação em curso e a necessidade de recorrer a técnicas invasivas de diagnóstico precoce, como a AMN ou a biopsia das vilosidades coriônicas em gestações aparentemente normais(11). Embora o resultado do RB reflita um risco diminuído, não deve ser um critério indicativo para a não realização destes estudos invasivos de DPN.

O RE é realizado nos três trimestres de gravidez, como parte dos exames complementares periódicos realizados no CHCB. Consiste nas seguintes fases(3, 15):

- a) 1.º Trimestre (entre 11-14 semanas de gestação) para a datação da gravidez, medição da TN e avaliação de outros marcadores de CF (ossos do ponte nasal, ductos venosos, etc.), diagnóstico da gestação multifetal, patologia ovular, detecção de malformações e patologias ginecológicas associadas.
- b) 2.º Trimestre (entre 20-22 semanas) para a detecção de malformações (realiza-se o estudo morfológico completo), avaliação do crescimento fetal, localização da placenta, volume do líquido amniótico, dinâmica fetal, patologia funicular e o sexo fetal.
- c) 3.º Trimestre (entre 32-36 semanas) para a avaliação do crescimento fetal, detecção de malformações, patologia e localização placentárias, volume do líquido amniótico, dinâmica fetal, perfil biofísico fetal e fluxometria (quando é indicado).

A Fluxometria Doppler (FD) é uma técnica de RE com grande valor porque permite a caracterização do risco gestacional, podendo facilitar a programação da vigilância e a gestão da intervenção obstétrica quando apresenta padrões fluxométricos anómalos, os quais estão consistentemente relacionados com maus resultados gestacionais e perinatais, tais como: pré-eclâmpsia, atraso de crescimento intrauterino, abruptio placentae e morte fetal ou parto pré-termo, entre outras utilidades(3). Entre as 10-14 semanas de gestação, se a FD revelar a existência de velocidade diminuída ou invertida durante a contração auricular (“onda A”) nos fetos com TN aumentada, pode indicar a presença de cromossomopatias e/ou cardiopatias, sendo um teste de rastreio de segunda linha(3).

Atualmente o risco de uma grávida de 35 anos ter um feto afetado por T21 é de 1 para 385. No entanto, a proporção de mulheres com mais de 35 anos já ultrapassa os 8%. Este grupo etário por si só não deve ser utilizado para a recomendação de técnicas invasivas de DPN, quando os testes não-invasivos de triagem para aneuploidias estão disponibilizados(3, 16). Logo, o aperfeiçoamento das técnicas de rastreio, entre as quais o RE tem sido decisivo e representa uma relação custo-benefício(4, 17).

A TN é um índice muito eficaz do RE, por ser simples, barata, fiável e sensível. A TN aumentada corresponde ao líquido acumulado no triângulo posterior do pescoço (edema

subcutâneo), observável como uma zona hipocogénica no exame ecográfico, associando-se fundamentalmente à presença de T21, outras aneuploidias e cardiopatias. A sua medição é aconselhável durante as 13 semanas, altura em que a TN é máxima, principalmente quando ultrapassa o percentil 95 para a idade gestacional. Nos fetos com cariótipo normal, a TN aumentada pode estar associada a síndromes genéticas, malformações congénitas, etc. (2, 18).

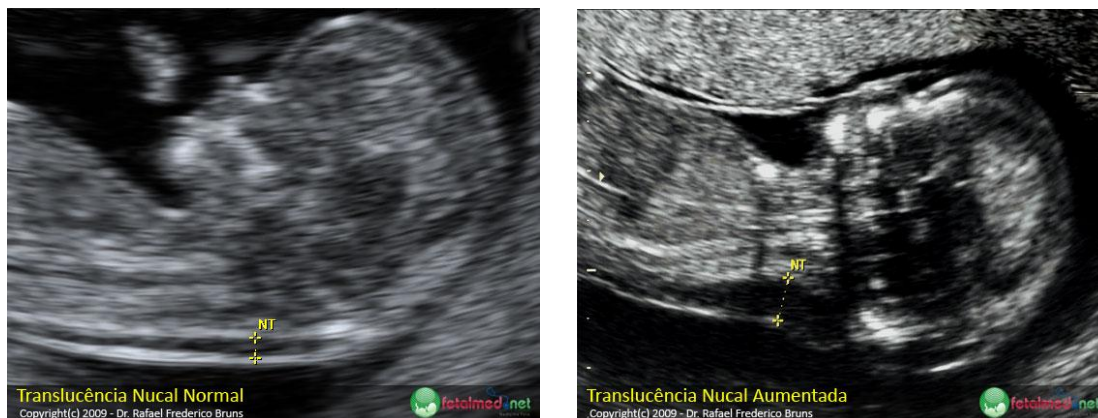


Figura 2 - Ecografias de fetos com TN Normal e TN Aumentada

Fonte: Fetalmed, 2012 (<http://www.fetalmed.net/item/o-que-e-translucencia-nucal.html>)

A presença da TN aumentada no RE é um critério indiscutível para realizar a AMN, estabelecendo deste modo o diagnóstico precoce de CF. As medidas a tomar perante a TN aumentada podem ser(2):

- Ecografia para a avaliação dos ossos do nariz (ausentes em 73% dos casos com trissomias) e do ducto venoso;
- Ecografia às 16-17 semanas, com AMN e ecocardiografia; nos casos com cariótipo normal sem anomalias ecográficas, incluindo TN normal, não necessitam de avaliação ulterior.
- Ecografia às 20-22 semanas, ecocardiografia fetal e rastreio de infeções do grupo TORCH e parvovírus B19 (serologia materna), nos casos em que se verifica a existência do cariótipo normal, sem anomalias ecográficas e quando a TN está aumentada.
- AMN para pesquisa de infeções; nos casos com TN persistentemente aumentada sem outras anomalias ecográficas.

O desenvolvimento recente de métodos de rastreio pré-natal de AC tem tido um grande impacto no DPN. Porém, os protocolos de DPN aplicados a grávidas consideradas de alto risco pelos padrões habituais (idade materna igual ou superior a 35 anos e/ou história familiar de doença genética) apresentam obstáculos, pois não permitem detetar(3):

- 80% dos recém-nascidos vivos com T21 em mulheres com menos de 35 anos e a quem a AMN não foi aplicada;
- 95% dos recém-nascidos com defeitos do tubo neural e que constituem o primeiro caso na família.

Estes foram os argumentos que serviram de base para o desenvolvimento da presente investigação, cujos objetivos foram os seguintes:

Objetivo principal

Avaliar o valor das técnicas não invasivas (RB e RE) na detecção de CF, assim como determinar a população de risco que deve ser submetida à confirmação diagnóstica por AMN no CHCB.

Objetivos secundários

- Analisar a frequência de ocorrência de CF em idades maternas (menores que 35 anos, entre 35 e 39 anos, maiores que 39 e todas as idades) e sem antecedentes de aneuploidias.
- Correlacionar o resultado do RB com a AMN para definir a sua especificidade e Sens no CHCB.
- Correlacionar a existência de alterações ecográficas com o resultado de AMN para definir a sua especificidade e Sens no CHCB.
- Verificar qual dos rastreios, RB com risco elevado ou marcadores ecográficos alterados, está mais associado à ocorrência de CF.

Hipóteses experimentais

H1 - A frequência observada de CF em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos e com RE normal (E-) é baixa mas diferente de zero:

$$(VPN \text{ de } E_{\geq 35} < 1)$$

H2 - A frequência observada de CF em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos e com RB normal (B-) é baixa mas diferente de zero:

$$(VPN \text{ de } B_{\geq 35} < 1)$$

H3 - A frequência observada de CF em mulheres com idade inferior a 35 anos e com RE normal (E-) é baixa mas diferente de zero:

$$(VPN \text{ de } E_{< 35} < 1)$$

H4 - A frequência observada de CF em mulheres com idade inferior a 35 anos e com RB normal (B-) é baixa mas diferente de zero:

$$(VPN \text{ de } B_{< 35} < 1)$$

H5 - A frequência observada de CF em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos e com RE e RB normais (EB-) é zero:

$$(VPN \text{ de } EB_{\geq 35} = 1)$$

H6 - A frequência observada de CF em mulheres com idade inferior a 35 anos e com RE e RB normais (EB-) é zero:

$$(VPN \text{ de } EB_{< 35} = 1)$$

H7 - Os RE e RB (realizado antes da AMN) em mulheres com qualquer idade e sem antecedentes de aneuploidias constituem um teste de grande utilidade, quando revela resultados normais (EB-) sendo capaz de orientar a realização da AMN:

$$(VPN \text{ de } EB = 1)$$

$$(\text{Sens de } EB = 1)$$

Materiais e Métodos

Tipo de estudo e população

Para o desenvolvimento da presente investigação foi importante analisar o RE, o RB e a AMN, indicados para a obtenção do correto DPN, tendo por base o levantamento de dados do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB). Este estudo é transversal, retrospectivo e documental, cujos dados foram recolhidos num só momento através da análise de processos clínicos, referentes a um período anterior ao início do estudo(19).

Foram selecionadas 300 mulheres com idades gestacionais compreendidas entre as 15-20 semanas, sem antecedentes de aneuploidias, e que realizaram a AMN na consulta de DPN do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do CHCB, no período de 9 outubro de 2008 a 12 de setembro de 2011 (quadro 1).

| Grupos etários | N.º AMN realizadas | Crítérios para AMN |
|----------------|--------------------|---|
| Idade <35 | 46 | RB e/ou RE alterado |
| | 36 | Outras indicações: ansiedade, abortos repetidos, ingestão de medicamentos com contra-indicações para a gestação, testes de toxoplasmose e CMV positivos |
| Idade ≥35 | 218 | Idade ≥35 |
| TOTAL | 300 | |

O método de amostragem foi acidental(19). Começou com a última AMN registada, a 12 de setembro de 2011, na consulta de DPN deste serviço, dando continuidade à recolha dos dados retrospectivos até se obter a dimensão de 300 casos, terminando no registo que data a 9 de outubro de 2008.

A dimensão da amostra foi escolhida *à priori* com base no argumento de que 2/3 das grávidas registadas tivessem idade superior a 35 anos, ou seja, 100 grávidas têm idade <35 anos e 200 com ≥ 35 anos, valores típicos para estudos de frequências(19, 20). Dentro dos critérios de inclusão, foram consideradas grávidas que realizaram AMN pelos seguintes motivos: RB e/ou RE alterado, idade materna superior a 35 anos e outras causas referidas anteriormente. Foram excluídas as que mostraram antecedentes familiares de aneuploidias e as que tiveram parto fora do hospital. Cada participante foi estudado através da consulta do seu processo clínico: antecedentes pessoais e do outro progenitor, história familiar, antecedentes obstétricos e gestação atual.

No caso das pacientes do CHCB, o RB é analisado no Hospital Pediátrico de Coimbra, após o envio da amostra de soro e dos seguintes dados de cada grávida: etnia, peso, hábitos tabágicos, diabetes mellitus, procriação medicamente assistida, data da última menstruação, dados ecográficos (data da ecografia, diâmetro biparietal, comprimento crânio-caudal,

comprimento do fémur, idade gestacional ecográfica e TN), exclusão de anencefalia, exclusão gemelar e a idade gestacional expressada em semanas até ao momento da recolha da amostra de soro. Todos estes dados são introduzidos no software *SsdwLab5*, o qual permite calcular o grau de risco para as trissomias 13, 18, 21, X e Y. O resultado é posteriormente reenviado para o CHCB, onde os especialistas em ginecologia e obstetrícia decidem a conduta que as pacientes devem seguir. Para cada paciente foram registados os dados dos RB e RE, assim como de AMN, para estabelecer as correspondentes correlações e desenvolver desta forma o estudo.

Métodos estatísticos

Procedimentos para estudos de diagnóstico

Considerando a AMN como *Goldstandard* para a deteção de CF, foram realizados “testes de diagnóstico” para o RB (B), para o RE (E) e para os dois rastreios tomados em conjunto (EB), construindo tabelas de contingência para cada grupo etário.

Para cada teste (E, B e EB) foram calculados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), considerando separadamente cada grupo etário: menores que 35 anos, maiores ou iguais que 35 anos, maiores ou iguais que 39 anos e todas as idades (Quadro 2).

| Quadro 2. Definições para os testes de diagnóstico | | | | | |
|--|----|--------------------------------|----|-----------------------------|---------------------------------------|
| | | Amniocentese (Goldstandard) | | DP - positivo para a doença | |
| | | | | DN - negativo para a doença | |
| | | | | TP - teste positivo | Sensibilidade=VP/DP |
| | | | | TN - teste negativo | Especificidade=VN/DN |
| | | | | VP - verdadeiro positivo | VPP (valor preditivo positivo) =VP/TP |
| | | | | FN - falso negativo | VPN (valor preditivo negativo) =VN/TN |
| | | | | FP - falso positivo | |
| | | | | VN - verdadeiro negativo | |
| Teste | TP | VP | FP | | |
| | TN | FN | VN | | |

O grupo das mulheres grávidas menores que 35 anos, com resultados dos rastreios alterados (E+, ou B+, ou EB+), foi considerado o grupo de controlo. Assim, foram construídas tabelas de contingência e realizada uma análise de risco, a partir do cálculo das “possibilidades” (*odds*) e das “possibilidades relativas” (*odds-ratios*) (Quadro 3).

| Quadro 3. Definições para as tabelas de contingência | | | |
|--|----------|----------|--|
| | | Doença | $Odds_{\text{controlo}} = \frac{a}{b}$ |
| | | + | |
| Controlo | <i>a</i> | <i>b</i> | $OddsRatio = \frac{a/b}{c/d}$ |
| Experimental | <i>c</i> | <i>d</i> | |

A base de dados e os cálculos foram elaborados com utilização do programa Excel 2007.

Resultados

Das 46 grávidas com idade inferior a 35 anos, com rastreios alterados (E+, ou B+, ou EB+) e sem antecedentes de aneuploidias verificaram-se 3 AMN positivas e 43 negativas.

Das 218 AMN realizadas em grávidas com idades iguais ou superiores a 35 anos, 13 tiveram rastreio positivo (i.e. E+ e B-, ou E- e B+ ou E+ e B+, adiante referido como EB+) e verificaram-se 3 AMN positivas; 205 tiveram rastreios negativos (i.e. E- e B-, adiante referido como EB-), logo nenhuma AMN positiva. Foram também contabilizados os resultados para os subgrupos com idade igual ou superior a 39 anos e com idades entre 35 e 39 (Tabela 1).

| Tabela 1. Resultados das AMN, RB e RE, por mulher grávida, segundo a idade | | | | | |
|--|------------|-------------|------------|---------------|-------|
| Idade [anos] | <35 | ≥35 | ≥39 | Entre 35 e 39 | Todas |
| Nº de exames | 82 (17,4%) | 218 (82,6%) | 73 (27,7%) | 145 (54,9%) | 300 |
| amnio. + (c/E+ e/ou B+) | 3 | 3 | 2 | 1 | 6 |
| amnio. - | 79 | 215 | 71 | 144 | 294 |
| E+ ou B+ | 46 | 13 | 3 | 10 | 59 |
| E- e B- | 36 | 205 | 70 | 135 | 241 |

Uma vez que todas as grávidas com idade igual ou superior a 35 anos são rastreadas, verifica-se que no CHCB a incidência de CF foi de 1,38% (0,69% para idades entre 35 e 39 anos, e 2,74% para idades iguais ou superiores a 39 anos).

As hipóteses enunciadas acima foram testadas com recurso às tabelas de contingência apresentadas nos quadros seguintes, onde também se indicam os valores dos quatro parâmetros usualmente utilizados para a caracterização dos testes de diagnóstico.

Tabela 2. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade <35 anos (N= 82)

| Idade < 35 | | | | Idade < 35 | | | | Idade < 35 | | | | | | |
|--------------|-----|---|-----|--------------|---|-----|-----|--------------|----|----|-----|---|----|----|
| amniocentese | | | | amniocentese | | | | amniocentese | | | | | | |
| | + | - | tot | | + | - | tot | | + | - | tot | | | |
| B | + | 2 | 24 | 26 | E | + | 2 | 21 | 23 | EB | + | 3 | 43 | 46 |
| | - | 1 | 55 | 56 | | - | 1 | 58 | 59 | | - | 0 | 36 | 36 |
| | tot | 3 | 79 | 82 | | tot | 3 | 79 | 82 | | tot | 3 | 79 | 82 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Sens= 0,667 | Sens= 0,667 | Sens= 1,000 |
| Espec= 0,696 | Espec= 0,929 | Espec= 0,456 |
| VPP= 0,077 | VPP= 0,087 | VPP= 0,065 |
| VPN= 0,982 | VPN= 0,996 | VPN= 1,000 |

Tabela 3. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade <35 anos, com resultados de E e/ou B anormais (N= 46)

| idade < 35 | | | | idade < 35 | | | | idade < 35 | | | | | | |
|--------------|-----|---|-----|--------------|---|-----|-----|--------------|----|----|-----|---|----|----|
| amniocentese | | | | amniocentese | | | | amniocentese | | | | | | |
| | + | - | tot | | + | - | tot | | + | - | tot | | | |
| B | + | 2 | 24 | 26 | E | + | 2 | 21 | 23 | EB | + | 3 | 43 | 46 |
| | - | 1 | 19 | 20 | | - | 1 | 22 | 23 | | - | 0 | 0 | 0 |
| | tot | 3 | 43 | 46 | | tot | 3 | 43 | 46 | | tot | 3 | 43 | 46 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Sens= 0,667 | Sens= 0,667 | Sens= 1,000 |
| Espec= 0,442 | Espec= 0,512 | Espec= 0,000 |
| VPP= 0,077 | VPP= 0,087 | VPP= 0,065 |
| VPN= 0,950 | VPN= 0,957 | VPN= - |

Tabela 4. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade ≥ 35 anos (N= 218)

| idade ≥ 35 | | | | idade ≥ 35 | | | | idade ≥ 35 | | | |
|-----------------|---|-----|-----|-----------------|---|-----|-----|-----------------|---|-----|-----|
| amniocentese | | | | amniocentese | | | | amniocentese | | | |
| | + | - | tot | | + | - | tot | | + | - | tot |
| B | 3 | 7 | 10 | E | 2 | 4 | 6 | EB | 3 | 10 | 13 |
| | 0 | 208 | 208 | | 1 | 211 | 212 | | 0 | 205 | 205 |
| tot | 3 | 215 | 218 | tot | 3 | 215 | 218 | tot | 3 | 215 | 218 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Sens= 1,000 | Sens= 0,667 | Sens= 1,000 |
| Espec= 0,967 | Espec= 0,981 | Espec= 0,953 |
| VPP= 0,300 | VPP= 0,333 | VPP= 0,231 |
| VPN= 1,000 | VPN= 0,995 | VPN= 1,000 |

Tabela 5. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em grávidas com idade ≥ 35 anos, com resultados de E e/ou B anormais (N=13)

| idade ≥ 35 | | | | idade ≥ 35 | | | | idade ≥ 35 | | | |
|-----------------|---|----|-----|-----------------|---|----|-----|-----------------|---|----|-----|
| amniocentese | | | | amniocentese | | | | amniocentese | | | |
| | + | - | tot | | + | - | tot | | + | - | tot |
| B | 3 | 7 | 10 | E | 2 | 4 | 6 | EB | 3 | 10 | 13 |
| | 0 | 3 | 3 | | 1 | 6 | 7 | | 0 | 0 | 0 |
| tot | 3 | 10 | 13 | tot | 3 | 10 | 13 | tot | 3 | 10 | 13 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Sens= 1,000 | Sens= 0,667 | Sens= 1,000 |
| Espec= 0,300 | Espec= 0,600 | Espec= 0,000 |
| VPP= 0,300 | VPP= 0,333 | VPP= 0,231 |
| VPN= 1,000 | VPN= 0,857 | VPN= - |

Tabela 8. Comparação dos testes RB, RE e EB com os resultados da AMN, em todas as grávidas da amostra (N= 300)

| Idade: todas | | | | Idade: todas | | | | Idade: todas | | | |
|--------------|---|-----|-----|--------------|---|-----|-----|--------------|---|-----|-----|
| amniocentese | | | | amniocentese | | | | amniocentese | | | |
| | + | - | tot | | + | - | tot | | + | - | tot |
| B | 5 | 31 | 36 | E | 4 | 25 | 29 | EB | 6 | 53 | 59 |
| | 1 | 263 | 264 | | 2 | 269 | 271 | | 0 | 241 | 241 |
| tot | 6 | 294 | 300 | tot | 6 | 294 | 300 | tot | 6 | 294 | 300 |

| | | |
|--------------|--------------|--------------|
| Sens= 0,833 | Sens= 0,667 | Sens= 1,000 |
| Espec= 0,895 | Espec= 0,915 | Espec= 0,820 |
| VPP= 0,139 | VPP= 0,138 | VPP= 0,102 |
| VPN= 0,996 | VPN= 0,993 | VPN= 1,000 |

Na tabela 9 apresenta-se a comparação, segundo as idades, entre o número das AMN positivas e as negativas, para todas as grávidas da amostra que tiveram EB+, indicando os “odds”, isto é, a “possibilidade” de terem CF (A+) com EB+, e comparando-as com o grupo de controlo.

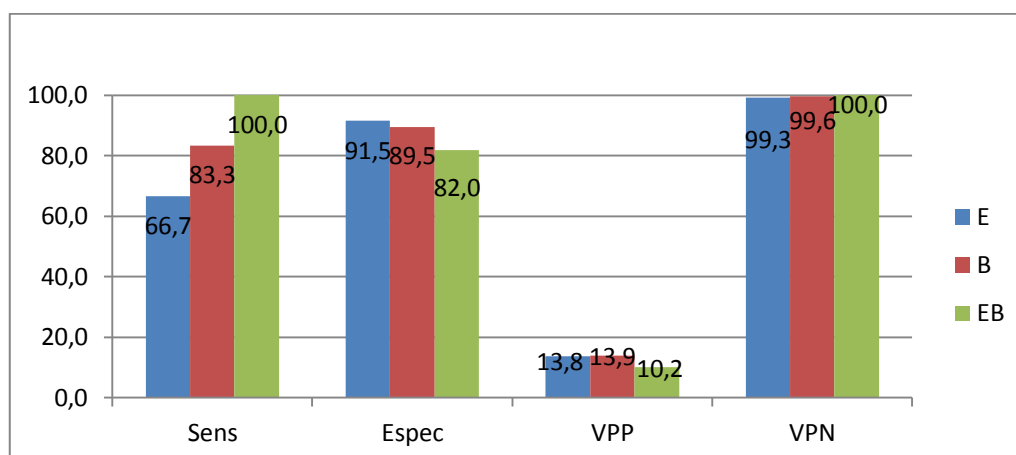
| Grupos | A+ | A- | “odds”(A+/A-) | “odds ratio” |
|------------------------|----|----|---------------|--------------|
| Idade < 35 c/ EB+ | 3 | 43 | 0,07 | - |
| 35 ≤ Idade < 39 c/ EB+ | 1 | 9 | 0,11 | 1,6 |
| Idade ≥ 39 c/ EB+ | 2 | 1 | 2,00 | 28,6 |

Pode também verificar-se que o “Odds-Ratio” das mulheres com mais de 39 anos e com EB+, relativamente às grávidas com idade entre 35 e 39 anos, também com EB+, é igual a 18,2 (2,00/0,11).

Na tabela 10 apresenta-se a comparação entre o número de AMN positivas e negativas para grávidas que tenham idades entre os 35 e 39 anos e maiores do que 39 anos.

| Grupo | A+ | A- | “odds” (A+/A-) | “odds ratio” |
|-----------------|----|-----|-------------------|--------------|
| 35 ≤ Idade < 39 | 1 | 144 | 0,007 | - |
| Idade ≥ 39 | 2 | 71 | 0,028 | 4 |

Gráfico 1. Medidas de desempenho dos testes (todas as idades)



No CHCB durante o período de 36 meses (desde 9 de outubro de 2008 a 12 de setembro de 2011) foram detectados 6 casos de CF em grávidas, das quais 3 com idade superior ou igual a 35 anos e 3 com idade inferior a 35 anos sem antecedentes de CF (tabela 3 e 5).

Quanto à correlação entre os resultados dos testes RE e RB com a ocorrência de CF para todas as idades, o RE mostrou uma Sens = 67% e o RB 83%, isto é, das 6 AMN com resultados positivos de CF (A+), 4 foram detectadas pelo RE e 5 pelo RB (tabela 8). Por outro lado, os VPN de ambos os testes são aproximadamente iguais (99,3% e 99,6% respetivamente). Desta forma pode concluir-se que na amostra o RB parece preferível, por conseguir detetar maior número de CF. No entanto, os valores da Sens de ambos os testes são demasiado baixos, o que significa que estes deixam escapar respetivamente 33% e 17% das CF.

No que diz respeito aos dois testes em conjunto (EB): se o teste EB for positivo quando se obtiver um resultado positivo em E, ou um resultado positivo em B, ou resultado positivo nos dois, e se o teste EB for negativo apenas quando E for negativo e B também for negativo, então os valores da Sens e do VPN que se obtêm melhoram ambos para 100% (gráfico 1).

Uma vez que:

- Sens = percentagem de grávidas com AMN positiva que testaram positivo, relativamente a todas as portadoras de CF,
- $(1 - \text{Sens})$ = proporção de doentes positivos cujo teste foi negativo, e que,
- VPN = probabilidade que uma grávida com teste negativo seja realmente negativa,

Pode concluir-se que na amostra e no período em estudo:

- Se uma grávida é portadora de CF, o resultado do teste EB é certamente positivo (nenhuma grávida portadora de CF apresentará um teste com resultado negativo), pois Sens = 1;
- O teste conjunto EB não deixou nenhuma CF por detetar ($1 - \text{Sens} = 0$);

- Quando o teste EB mostra resultados normais significa que a grávida não é portadora de CF (VPN=1).

Por outro lado, como:

- VPP = probabilidade que uma grávida cujo teste é positivo seja realmente positiva,

Pode também concluir-se:

- Quando o teste EB manifesta resultados positivos (alterado) a grávida pode ou não ter CF, (VPP baixo); o que implica a necessidade de realizar estudos invasivos de DPN.

É interessante refletir sobre o número de AMN realizadas pelo CHCB considerando os dados do presente estudo. Nas grávidas com idade igual ou superior a 35 anos foram realizadas 218 AMN, no serviço do CHCB, das quais 3 foram positivas e 215 negativas. Se o teste EB pudesse ser aceite como um método de rastreio sensível e útil, em vez de 218 AMN teriam sido feitas apenas 13, detetando-se as mesmas 3 CF.

No grupo de todas as idades (excluindo as que apresentaram antecedentes de doença genética) foram realizadas 300 AMN no serviço de Ginecologia e Obstetrícia, das quais 6 foram positivas e 294 negativas. Uma vez mais, se tivesse sido usado o teste EB como método de rastreio, em vez de 300 teriam sido realizadas apenas 59 AMN, detetando as mesmas 6 CF. Isto representa uma redução de 5,1 vezes o número de AMN realizadas (tabela 11).

Tabela 11. AMN e CF Detetadas

Comparação entre os resultados verificados no CHCB (9.10.2008 a 12.09.2011) e os resultados possíveis considerando o teste EB

| Todas as idades (excluindo antecedentes genéticos) | | | Idade ≥ 35 | | |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| | Amniocenteses CHCB | Amniocenteses por EB+ | | Amniocenteses por protocolo DPN | Amniocenteses por EB+ |
| Total | 300 | 59 | Total | 218 | 13 |
| Cromossomopatias | 6 | 6 | Cromossomopatias | 3 | 3 |
| Normais | 294 | 53 | Normais | 215 | 10 |

Resumindo, embora o teste conjunto EB não tenha o mesmo VPP da AMN (VPP=1), parece no entanto conseguir um VPN=1 e uma Sens=1, o que significa que se pode evitar a realização da AMN e consequentes implicações.

Discussão

O objetivo global da assistência pré-natal é assegurar que a gravidez culmine no nascimento de uma criança saudável, sem prejuízo para a saúde materna. Por isso, é muito importante proporcionar um programa de rastreio/vigilância, tanto clínico como laboratorial, a fim de assegurar o normal decurso da gravidez e detetar, precocemente, eventuais desvios da normalidade(3).

O primeiro rastreio pré-natal bioquímico para detetar T21 foi criado por Merkatz e Cols em 1984, que registaram a sua associação a valores baixos de AFP no soro materno. No entanto, usando apenas a idade materna e a AFP como marcador sérico, a TD de T21 não ultrapassou os 36% (para 5% de falsos positivos). Posteriormente foram descritos outros métodos analíticos úteis no rastreio de T21: Beta-HCG (aumentada na T21), PAPP-A (reduzida na T21), estriol não conjugado (reduzido na T21), e a inibina-A (aumentada na T21). A combinação dos diferentes marcadores permitiu melhorar progressivamente a eficiência de deteção dos cerca de 30% para 50-80%. Atualmente são vários os protocolos de RB aplicáveis(3).

Em 1992 Nicolaidis e Col. designaram pela primeira vez a TN como um bom marcador ecográfico, tendo ainda um importante significado epidemiológico quando está aumentada, já que é uma expressão fenotípica frequente de T21, de outras cromossomopatias, assim como de prevalência elevada de cardiopatias fetais(3).

Graças a estes estudos, atualmente podemos contar com técnicas de deteção de grande valor tais como: RB e RE. Foi com base na análise dos resultados destes rastreios que se prosseguiu com esta investigação e foi possível comparar os resultados do RB e do RE com os das AMN, para observar a frequência de ocorrência de CF nos diferentes grupos etários (<35 anos, ≥ 35 anos, ≥ 39 anos e todas as idades).

No CHCB durante o período de 36 meses (desde 9 de outubro de 2008 a 12 de setembro de 2011) foram detetados 6 casos de CF em grávidas com idades gestacionais compreendidas entre as 15-20 semanas, sem antecedentes de aneuploidias (tabela 1 e 8).

Analisando os RE e os RB individualmente não é possível detetar quais as grávidas, independentemente das suas idades, que devem ser submetidas à confirmação do diagnóstico por técnicas invasivas de DPN, como a AMN, porque cada rastreio apresenta TD baixas (Sens <1 e VPN <1). Isto pode ser evidenciado no presente estudo se considerarmos, por exemplo, a TD para o grupo de grávidas com menos de 35 anos, em que a Sens é de 67% em ambos os rastreios RB e RE, e VPN é de 99% no RE e 98% no RB (tabela 2), enquanto que para o grupo com idades iguais ou superiores a 35 anos a Sens do RE é de 67% e o VPN é 99%, mas o RB já tem uma Sens e VPP de 100% (tabela 4). Como os resultados dos rastreios analisados não têm uma Sens e VPN de 100% verifica-se que uma análise isolada de cada rastreio é insuficiente para detetar o total de CF. Se analisarmos os dois métodos de rastreio em conjunto (EB) para todos os grupos de idades as TD melhoram para 100% (Sens e VPP = 1), o que proporcionaria uma orientação mais fundamentada para a realização da AMN em todas as

gravidezes sem antecedentes de aneuploidias. Isto seria difícil de se verificar se os resultados de cada rastreio fossem analisados individualmente (tabela 8).

Esta análise vai ao encontro de três estudos publicados em 2007, 2009 e 2012, cujos resultados demonstram que ao considerar isoladamente a TN como método de RE para a deteção de T21, defeitos cardíacos e outras anormalidades genéticas, a TD é baixa, igual a 62%, e taxa de falsos positivos é de 5%. No entanto, quando o RE é usado em combinação com o RB pode obter-se uma TD de 90% e 5% de falsos positivos(9, 21, 22).

No presente estudo, segundo as diferentes indicações que sugerem a realização da AMN, foi possível analisar que no grupo com idades menores de 35 anos, composto por 82 grávidas e todas se submeteram à AMN, mas só 46 tinham RB e/ou RE alterados e apenas 3 CF foram detetadas. Isto é, poder-se-iam ter feito apenas 46 AMN em vez das 82. As restantes 36 grávidas com RB e RE normais, dado que tinham outras indicações (ansiedade, ingestão de medicamentos durante a gravidez, abortos repetidos, etc.) tiveram que realizar a AMN, mas mesmo assim os resultados foram normais (tabela 1 e 2).

Das 218 AMN realizadas às grávidas que tinham idades iguais ou maiores de 35 anos, só 13 tinham RB e/ou RE alterados, mas só 3 confirmaram a presença de CF. As restantes 205 AMN não apresentaram nenhum resultado de CF (tabela 1 e 4).

Dos resultados anteriormente referidos, por maioria de razão são válidos para o grupo com idades iguais ou superiores a 39 anos (tabela 1 e 6).

Portanto, as 241 AMN realizadas em grávidas que não apresentavam RE e RB alterados podiam ter sido evitadas.

Estas análises vêm confirmar a ideia de que os RE e RB, realizados antes da AMN, em mulheres com qualquer idade e sem antecedentes de aneuploidias constituem um teste de grande utilidade, quando revelam resultados normais (EB-), pois podem evitar a realização da AMN e suas conseqüentes implicações.

Destaca-se também que a possibilidade de ter CF (A+) quando os resultados do RB ou RE são positivos é significativamente alta (tabela 9). A atual investigação vem demonstrar que quando o teste EB tem resultados positivos (alterados) em grávidas com qualquer idade, estas podem ou não ter CF (VPP baixo, indica que muitas grávidas testam “positivo” sem o serem), o que implica a necessidade de realizar estudos invasivos de DPN (gráfico 1).

Segundo Kypros Nicolaides (especialista do King’s College de Londres que esteve presente num encontro da Associação Nacional de Diagnóstico Pré-natal (ANDPN) realizado em Braga) esta política de se realizar as AMN a todas as mulheres com idades superiores a 35 anos é “totalmente errada”, até porque existe um rastreio fiável sem implicar perdas de bebés, realizado às 12 semanas, oferecendo um bem-estar para as mães. Cerca de 100 bebés saudáveis morrem em Portugal em cada ano, este é o preço a pagar pela realização das AMN recomendadas às grávidas com idade maior a 35 anos(23).

É também importante refletir sobre os custos inerentes à realização das AMN. No caso do CHCB cada AMN custa 168,99€. Se tivermos em conta as 300 AMN que constituem a amostra

do presente estudo subentende-se que o CHCB teve um custo total de 50.697,00€ (300x168,99€).

Se o CHCB considerasse o teste conjunto EB como sendo fiável antes da realização da AMN teria reduzido os custos para 9.970,41€ (59x168,99€), porque das 300 grávidas apenas 59 tinham resultados de RB e/ou RE alterados, e teriam detetadas as mesmas 6 CF. Ou seja, o CHCB poderia poupar cerca de 80,3%, o que representa uma redução de 5 vezes nos custos. Devemos também considerar o custo que o CHCB investe em cada RB (30€), o qual deve ser realizado a todas as grávidas. Assim, tendo em conta a amostra do estudo, o custo total de RB realizados foi de 9.000 euros (300x30€), ou seja, um valor ainda mais reduzido caso o RB fosse utilizado como método de rastreio de primeira linha, em vez da AMN.

Do mesmo modo, pode concluir-se que a mesma quantidade de CF pode ser diagnosticada com menos custos, se forem consideradas as técnicas conjuntas não invasivas de DPN (EB), as quais ajudam a identificar os grupos de alto risco que devem realizar a AMN, em todas as grávidas sem antecedentes de aneuploidias, independentemente da idade materna.

A principal limitação deste estudo foi a dimensão da amostra (N=300) que, apesar de conseguir corroborar os objetivos e hipóteses experimentais do estudo, revelou-se pequena devido à baixa incidência de cromossomopatias observadas (6/300=2%). Além disso, como os dados recolhidos apenas dizem respeito a um Centro Hospitalar, há uma restrição ao nível da generalização do estudo para os restantes hospitais e regiões do país, o que implica uma análise mais aprofundada.

Conclusão

Tendo em conta o objetivo principal desta investigação, sugere-se que as técnicas não invasivas bioquímicas e ecográficas realizadas em conjunto aparentam ser sensíveis e específicas, na medida em que os seus resultados permitem a identificação de grupos expostos ao risco de CF em todas as grávidas sem antecedentes de aneuploidias independentemente da idade materna. Por outro lado nas grávidas cujos RB e RE são completamente normais (EB-) e sem antecedentes de aneuploidias não precisam de ser submetidas à posterior realização da AMN, para a confirmação do diagnóstico.

Dada a importância que estas técnicas podem vir a assumir neste âmbito, seria essencial proceder-se à reavaliação dos diferentes protocolos de rastreio bioquímico (precoce, do 1.º e do 2.º trimestres), não só para reduzir ao mínimo a Taxa de Falsos Negativos, como também para diminuir o número de AMN realizadas. Isto pode representar uma diminuição drástica (5,1 vezes) do número de grávidas expostas ao risco (1%) de perdas fetais associadas à realização da AMN, entre outras complicações, além de reduzir os custos para o hospital, tanto ao nível de recursos materiais como humanos.

Desafios Futuros

Como desafio futuro sugere-se o aprofundamento deste estudo, aumentando a dimensão da amostra e alargando-a a outros hospitais e regiões do país, com o sentido de procurar rever os protocolos que sugerem a realização da AMN a todas as grávidas a partir dos 35 anos, considerando em alternativa a realização de um teste conjunto EB.

Referências Bibliográficas

1. Arroyo Carrera I. Clasificación de las alteraciones genéticas. *Pediatría Integral*. 2010;14(8):589-603.
2. Ayres de Campos D, Montenegro N, Rodrigues T. MN, Rodrigues T. *Protocolos de Medicina Maternofetal*. 2 ed. Lisboa: Lidel; 2008.
3. Mendes da Graça L. *Medicina Materno Fetal*. 3 ed, editor. Lisboa: Lidel; 2005.
4. Lorda-Sánchez I. RC, Ayuso C. Consulta genética y diagnóstico genético prenatal. *Pediatría Integral* 2010. 2010;14(8):604-12.
5. Méndez Rosado, L.A, et al. Diagnóstico prenatal citogenético mediante la hibridación in situ con fluorescencia. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2012;38(1):1-10.
6. Ajayi GO. Ultrasonography-guided amniocentesis in singleton pregnancies: a review of the first 1,000 cases. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2011;38(4):405.
7. Daniilidis A, et al. A four-year retrospective study of amniocentesis: one centre experience. *Hippokratia*. 2008;12(2):113.
8. Subirá D, Uriel M, Serrano C. Significance of the volume of fetomaternal hemorrhage after performing prenatal invasive tests. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2011;80(1):38-42.
9. S L Clins, L Impey. Prenatal diagnosis: Types and techniques. *Early human development*. 2012;88(1):3-8.
10. Driscoll DA, Gross SJ. Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. *Genetics in Medicine*. 2009;11(11):818-21.
11. Bagherizadeh E, M Oveisi, Z Hadipour. Triploidy in a fetus following amniocentesis referred for maternal serum screening test at second trimester. *Indian journal of human genetics*. 2010;16(2):94.
12. Bussières L, Rozenberg P, Bault JP, Ville Y. First trimester Down syndrome screening program using nuchal translucency and maternal serum markers: the Echo PAPP-A. 78 study]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2004;33(1 Suppl):S61.
13. Liu F, et al. Second Trimester Prenatal Screening for Down's Syndrome in Mainland Chinese Subjects using Double-Marker Analysis of α -fetoprotein and β -human Chorionic Gonadotropin Combined with Measurement of Nuchal Fold Thickness. *Annals of the Academy of Medicine-Singapore*. 2011;40(7):315.
14. Haddow, J E, et al. Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum markers for screening. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(16):1114-8.
15. A.P.D.P. *Ecografia na Gravidez de baixo risco*. Centro de Diagnóstico Pré-natal do Hospital Garcia de Orta. 2011.
16. Audibert F, Gagnon A. Prenatal screening for and diagnosis of aneuploidy in twin pregnancies. *Obstet Gynaecol Can*. 2011;33(7):754.
17. Huamán-Guerrero M, Quiroga de Michelena M, Arias J, Huamán M. Diagnostico prenatal de anomalías cromosómicas. *Revista peruana de ginecología y obstetricia*. 2007;53(3):181-186.

18. Rafael Frederico Bruns. Translucência Nucal no rastreamento de Cardiopatias Congénitas em fetos cromossomicamente normais. São Paulo. 2005.
19. Macedo A GN. Estatística Precisa-se! Conceitos e técnicas aplicadas às ciências da Saúde. 1 ed. Lisboa: Sílabo, Lda; 2010.
20. Bland M. An Introduction to Medical Statistics. 3 ed: Oxford; 2009.
21. Kipros Herodotou N, Lusiana de Barros Duarte, Alessandra Cristina Marcolim, Geraldo Duarte. First-trimester screening for chromosomal abnormalities. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2007;29(12):647-653.
22. Henriques S. Rastreio pré-natal de cromossomopatias e defeitos do tubo neural. Como atuar? Rev Port Clin Geral. 2009;25:320-31.
23. Costa e Silva, Elsa. Cem fetos morrem todos os anos em Portugal por amniocentese evitáveis [Web page] Lisboa: Diário de Notícias; 2007 [updated 2007; cited 2012 12 maio]; Disponível em: http://www.dn.pt/inicio/interior.aspx?content_id=657524