

Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas

**Maria T. V. Sanseverino¹, Rejane G. Kessler¹, Maira G. Burin¹,
Nina R. Stein², Rafaela F. Herman², Ursula Matte¹,
Patrícia M. M. Barrios³, José A. Magalhães⁴**

OBJETIVO: O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as condições genéticas intra-útero foi um grande avanço na genética clínica, mudando a perspectiva reprodutiva de famílias de risco. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o programa de diagnóstico pré-natal (DPN) de anomalias congênitas faz parte do Grupo de Medicina Fetal, que é composto por uma equipe multidisciplinar, cuja meta principal é estudar, analisar, diagnosticar e aconselhar as gestantes de alto risco. O trabalho apresentado aqui tem como objetivos revisar os principais procedimentos de diagnóstico pré-natal, descrever a nossa amostra e os exames que são oferecidos às nossas gestantes.

MATERIAIS E MÉTODOS: De janeiro de 1989 a julho de 2001, foram cariotipadas 613 gestações, realizadas investigações enzimáticas em 86 casos e em 4 foram realizados estudos moleculares em material fetal. Um total de 1.378 novos casos foram avaliados no ambulatório de DPN do HCPA, de julho de 1993 a julho de 2001, para aconselhamento genético reprodutivo.

RESULTADOS: O diagnóstico pré-natal de cromossomopatias realizado no HCPA atingiu uma taxa de crescimento de culturas de 98%, índice semelhante ao dos países desenvolvidos.

CONCLUSÕES: O diagnóstico pré-natal é um importante recurso para as famílias com risco de anomalia fetal. Novas técnicas de diagnóstico estão em implantação no HCPA, e poderão contribuir ainda mais para o atendimento dessas famílias. Apresentamos também os aspectos éticos envolvidos e algumas perspectivas futuras na área do diagnóstico pré-natal de anormalidades congênitas.

Unitermos: Diagnóstico pré-natal; aconselhamento genético; cromossomopatias; erros inatos do metabolismo; malformações congênitas.

Prenatal Diagnosis: advances and prospectives

OBJECTIVE: The development of laboratorial techniques for the prenatal diagnosis of genetic diseases was a great step for clinical genetics, changing reproductive perspectives of high risk families. At Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), the prenatal diagnosis program is part of the Fetal Medicine Group, which includes several professionals of different areas. The main objective of this group is to study, evaluate, diagnose and

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

advice high risk pregnant women. The aim of the present study is to review the main procedures for the prenatal diagnosis and to show the results of our sample regarding the laboratory analysis offer to the pregnant women.

MATERIALS AND METHODS: From January 1989 to July 2001, karyotypes were performed for 613 pregnancies, metabolic studies were carried out in 86 pregnancies and molecular analysis was performed for four cases. Prenatal genetic counseling was given to 1,378 families.

RESULTS: The prenatal diagnosis of genetic diseases accomplished at HCPA reached a culture growth rate of 98%, which is similar to the result of developed countries.

CONCLUSIONS: The prenatal diagnosis is an important tool for the families that are likely to have fetal anomalies. New techniques of diagnosis are being introduced at HCPA, and they will contribute even more to the treatment of these families. Future perspectives and ethical aspects for prenatal diagnosis are also discussed.

Key-words: Prenatal diagnosis; genetic counseling; chromosomal anomalies; inborn errors of metabolism; congenital malformations.

Revista HCPA 2001(3):301-316

Introdução

O diagnóstico pré-natal permite a detecção, ainda no útero, de doenças que de outra forma somente seriam diagnosticadas após o nascimento. Milunsky, já em 1973, definiu como sendo a filosofia fundamental do diagnóstico pré-natal oferecer a um casal sob risco a possibilidade de ter uma criança normal, mesmo que a chance de ocorrer algum defeito seja extremamente elevada (1).

A partir dos anos 70, o desenvolvimento de técnicas como o cariótipo e ensaios enzimáticos em células fetais, a determinação de metabólitos no líquido amniótico e a ultra-sonografia propiciaram o diagnóstico pré-natal de desordens genéticas. Neste contexto, a amniocentese estabeleceu-se como técnica importante da obstetrícia moderna, associada a métodos precisos de diagnóstico e a um relativo baixo risco. O reconhecimento da alfa-fetoproteína, nos anos 70, um marcador para a detecção pré-natal de defeitos do tubo neural, abriu espaço para novas descobertas no campo da triagem sérica materna, tornando-se um importante avanço no diagnóstico pré-natal e abrindo a perspectiva de detecção pré-natal de defeitos fetais em gestações não suspeitas de risco. Com a coleta e a análise de vilosidades coriônicas, possibilitou-se um diagnóstico pré-natal mais precoce, ainda no primeiro trimestre, reduzindo a ansiedade da espera dos resultados para os casais em risco (1,2). Essas técnicas continuam sendo aperfeiçoadas e outras novas estão sendo descobertas.

O diagnóstico pré-natal possibilita a casais em risco terem filhos, o que não ocorreria caso o procedimento não estivesse disponível. O resultado imediato é que o número de crianças sadias nascidas é muito mais alto do que o número de gestações interrompidas por causa de detecção de um defeito grave (1).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o programa de diagnóstico pré-natal de anomalias congênitas está inserido no Grupo de Medicina Fetal, do qual fazem parte obstetras, geneticistas clínicos, neonatologista, enfermeiras, psicólogas, cardiologista pediátrico, citogeneticista, bioquímico e patologista.

O objetivo deste artigo é abordar os assuntos pertinentes ao cotidiano do diagnóstico pré-natal, apresentar os resultados de nosso trabalho nos últimos anos e revisar algumas perspectivas futuras.

O aconselhamento genético no diagnóstico pré-natal

O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as doenças genéticas intra-útero foi um grande avanço na genética clínica, mudando a perspectiva reprodutiva das famílias de risco e tornando o diagnóstico pré-natal parte integrante do processo de aconselhamento genético (3).

Freqüentemente, os procedimentos diagnósticos (amniocentese, coleta de vilosidades) acabam substituindo o aconselhamento genético nas gestações com risco elevado de anomalias. O

prejuízo pode ser grande, uma vez que um risco genético adicional, além daquele que motivou o exame e que não havia sido esclarecido previamente, pode estar presente em um número significativo de casos (4).

O momento ideal de aconselhamento genético com vistas ao diagnóstico pré-natal é antes da concepção (1, 3), para que, com tempo, se possa estabelecer o diagnóstico correto da condição, realizar exames adicionais nos pais quando necessário e disponível (cariótipo, estudos moleculares, etc), estabelecer o risco efetivo de recorrência, identificar se existem métodos diagnósticos pré-natais disponíveis, esclarecer os riscos e os custos envolvidos, discutir as alternativas decorrentes de um diagnóstico pré-natal normal ou anormal, permitindo ao casal uma decisão reprodutiva mais consciente. Por outro lado, o planejamento da gestação pode também contribuir para diminuição da recorrência de algumas patologias, como no uso periconcepcional de ácido fólico que diminui em 70% a recorrência dos defeitos de fechamento de tubo neural (5). Mais freqüentemente, porém, a gestante ou o casal são atendidos no curso da gestação, e corre-se contra o tempo na tentativa de oferecer a investigação mais adequada.

Na gestação, alguns aspectos importantes devem ser abordados com o casal durante a consulta de aconselhamento genético e antes da realização de exames invasivos. Devem fazer parte da avaliação: história obstétrica, história clínica e história familiar do casal, qual a anormalidade de risco e a probabilidade de ocorrência, qual o exame disponível e como vai ser realizado, qual o tempo de espera até o resultado, quais diagnósticos podem ser obtidos através deste exame, quais os riscos envolvidos na realização do procedimento invasivo e quais as conseqüências de um resultado anormal (6). Alguns aspectos importantes para a tomada de decisão pelo casal incluem a reflexão sobre algumas questões: 1. Estão de acordo com o procedimento invasivo; 2. se o feto for anormal, o que eles pensam que deve ser feito; 3. qual o impacto de uma interrupção de gestação; 4. no futuro, devem tentar uma nova gestação? Quando? (7).

A ansiedade do casal até a obtenção do resultado após um exame invasivo está sempre presente. No entanto, costuma ser maior naquelas pacientes inicialmente de baixo risco, que são surpreendidas durante a gestação pela necessidade deste exame por uma alteração na

triagem sérica ou anormalidades na ecografia (6).

A comunicação de um resultado anormal é uma das etapas mais difíceis do processo. A elaboração e a tomada de decisão é facilitada quando a paciente ou o casal foi adequadamente informado da possibilidade de ocorrência da anormalidade e das conseqüências do problema, e já refletiu sobre as diversas possibilidades, conversou com pessoas do seu grupo familiar e social, antes de ser confrontado com a necessidade de decidir pela continuidade ou não da gestação.

Uma particularidade que torna o processo de aconselhamento genético para diagnóstico pré-natal ainda mais complexo em nosso meio é a inexistência de legislação a respeito da interrupção da gestação nos casos de anomalia fetal no Brasil, abordada a seguir nos aspectos éticos.

Materiais e métodos

A experiência do ambulatório de aconselhamento genético para diagnóstico pré-natal (DPN)

Entre 1993 e julho de 2001, 1.378 novos casos foram atendidos no Ambulatório de Aconselhamento Genético para Diagnóstico Pré-Natal (DPN) do Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A consulta inicial envolvia uma gestação em curso em 923 casos (67%). As pacientes são encaminhadas para este ambulatório a partir de profissionais do SGM, de obstetras do HCPA ou através de Postos de Saúde.

Apresentamos, na tabela 1, a distribuição das consultas quanto ao motivo principal de encaminhamento ao ambulatório. A idade materna avançada foi o motivo mais freqüente das consultas (21,4%). Em conjunto, os antecedentes familiares desfavoráveis estavam presentes em 551 casos (40%).

A seguir, apresentamos algumas técnicas utilizadas para o diagnóstico pré-natal e a nossa experiência com cada uma delas.

Triagem sérica materna

A triagem sérica materna foi desenvolvida para identificação de anormalidades fetais em gestantes de baixo risco. A partir da observação da elevação de alfa-fetoproteína (AFP) nos soro de mulheres cujo feto apresentava anencefalia, diversos estudos estabeleceram a correlação

Tabela 1. Motivo Principal de consulta ao Ambulatório de Diagnóstico Pré-Natal

Motivo do encaminhamento	n	(%)
Idade materna avançada	295	21.4
História familiar de malformação	194	14.1
Abortos de repetição	183	13.3
Anomalia na ecografia	177	12.8
História familiar de doença cromossômica	155	11.2
Outro (exposições ambientais, etc)	127	9.2
História familiar de outra doença gênica	119	8.6
História familiar de Erros Inatos do metabolismo	43	3.1
História familiar de defeito de fechamento de tubo neural	40	2.9
Consangüinidade	39	2.8
Total	1378	100

entre os níveis de AFP sérica materna e defeitos de fechamento de tubo neural (DFTN), permitindo o desenvolvimento da triagem sérica universal para estes defeitos (1).

A alfa-fetoproteína é uma proteína produzida no feto pelo saco vitelino, trato gastrointestinal e fígado fetais, a partir de 29 dias após a concepção. Na circulação fetal, os níveis máximos de AFP são observados entre 10 e 13 semanas de gestação. A função biológica da AFP ainda não está estabelecida, havendo evidências de que exerça um papel imunológico, prevenindo a rejeição do feto pelo sistema imune materno. Na circulação materna, observa-se elevação da AFP a partir da 7ª semana de gestação, com pico máximo entre 28 e 32 semanas, em função da maior permeabilidade placentária a proteínas maternas (1).

O resultado da AFP no soro materno é expresso em múltiplos da mediana (MoM). A AFP está elevada nos defeitos de fechamento de tubo neural e nos defeitos fetais abertos, como a onfalocele e gastrosquise. O achado de um nível elevado de AFP deve ser seguido de uma ultrasonografia detalhada para identificação de anomalias fetais. Níveis elevados de AFP no segundo trimestre também têm sido associados a complicações obstétricas, como ruptura prematura de membranas, morte fetal, hipertensão, descolamento de placenta, entre outras (8).

O primeiro marcador sérico materno associado à síndrome de Down foi a AFP (9-11). Entre 1987 e 1988, a dosagem de gonadotrofina corônica humana (*human chorionic gonadotropin* – *hCG*) e de estriol não-conjugado foram identificados também como marcadores séricos que aumentavam a sensibilidade da triagem materna para Síndrome de Down (12). Os estudos demonstraram que a concentração de AFP e de estriol não conjugado eram mais baixas e a concentração de hCG mais alta nas gestações com Síndrome de Down com relação aos controles (13).

Diversos estudos têm demonstrado a viabilidade da realização da triagem sérica já no primeiro trimestre (14). A diminuição dos níveis de AFP nas gestações com Síndrome de Down já pode ser evidenciada entre 9 e 12 semanas. A combinação da dosagem da subunidade livre do beta-hCG (hCG livre) e da proteína A relacionada à gestação (*pregnancy-associated-protein A* ou *PAP-A*) tem uma sensibilidade semelhante à triagem de segundo semestre. Nas gestações com Síndrome de Down, a dosagem de hCG livre está elevada e a de PAP-A está diminuída.

A sensibilidade da triagem sérica no segundo trimestre para Síndrome de Down está em torno de 57% para uma taxa de falso-positivo de 5% (15).

Cada laboratório deve estabelecer a sua

Tabela 2. Ultra-sonografia para o diagnóstico pela idade gestacional em diferentes estágios da gestação^a

Até 14 semanas	17 a 20 semanas	20 a 24 semanas	28 a 32 semanas
Número de embriões	Pólo cefálico	Estruturas cerebrais	
Vitalidade embrio-fetal	Coluna vertebral	Face	Anomalias
Pólo cefálico	Face	Tórax e coração	esqueléticas
Coluna vertebral	Parede abdominal	Abdômen e aparelho	Nanismos
Membros	Diafragma	digestivo	Cistos de ovário
	Estômago	Rins	
	Bexiga	Membros e extremidades	
	Órgãos genitais externos		
	Membros e extremidades		

^a Modificado de Isfer, 1988.

curva para os diversos marcadores. No HCPA, estabelecemos a curva de nossas pacientes em líquido amniótico para AFP (16). No entanto, a curva de marcadores séricos ainda não foi estabelecida e, portanto, ainda não oferecemos este exame.

Ultra-sonografia

A ultra-sonografia é uma técnica diagnóstica que permite avaliação anatômica da gestação. O método empregado isoladamente (exame de ultra-som) permite o diagnóstico de aproximadamente 70 a 80% das malformações estruturais ou anatômicas do feto, dependendo da acuidade diagnóstica, da experiência do operador, do tempo despendido para a realização do exame e da qualidade técnica do aparelho empregado.

A ultra-sonografia permitiu que um mundo, antes inexplorado, passasse a ser invadido pelos olhos de todos. Possibilitou que muitas emoções aflorem quando as imagens mostram o que queremos ou o que não queremos ver (17).

Nas diferentes fases da gestação, a ultra-sonografia permite o reconhecimento de elementos distintos da evolução biológica da espécie, como está demonstrado na tabela 2.

Quando se aborda o diagnóstico genético fetal, podemos partir de um marcador ultra-sonográfico para indicar o estudo citogenético.

No HCPA, no período entre 1993 e 1995, realizamos 200 exames para estudo do cariótipo fetal (amniocenteses, BVC e cordocenteses).

Destes casos, 24 foram indicados por anomalia estrutural detectada previamente à ultra-sonografia. Os resultados mostraram 5 gestações com cariótipo alterado, conforme Tabela 3.

Translucência nugal

Outro aspecto que pode ser focado diz respeito a um teste de rastreio de risco gestacional para cromossomopatia (trissomias 21, 18 e 13), que se denomina translucência nugal. Através da medida do subcutâneo da nuca do feto, entre 11 e 14 semanas de idade gestacional (comprimento cabeça-nádega: 45 mm a 84 mm), pode-se selecionar pacientes para exames invasivos, como a biópsia de vilosidades coriônicas (BVC) ou amniocentese, baseado na correlação da espessura nugal aumentada e trissomias. Os cálculos de risco estão calcados em mais de 100 mil exames analisados. O resultado deve ser emitido em um número de probabilidade, levando-se em consideração a idade materna, tempo de gestação, antecedentes obstétricos e a medida da translucência nugal. Não apresenta perigo de perda da gravidez, o exame é realizado apenas por uma ultra-sonografia, indicado principalmente em pacientes de baixo risco pela idade, com menos de 35 anos (18).

Dados sobre valor preditivo positivo para trissomias 13, 18 e 21, calculados em função da medida da translucência nugal, podem ser obtidos na tabela 4.

Tabela 3. Malformações fetais, achados ultra-sonográficos e cariótipos alterados

Malformação	n	Cariótipos alterados
Hidropsia fetal não-rhesus	4*	
Hérnia diafragmática	3*	
Anencefalia	3*	
Dupla bolha	2*	47, XX, +21 (1 caso)
Onfalocele	2*	47, XY, +18 (1 caso)
Dandy-Walker	2*	
Gastrosquise	1*	
Hidrocefalia, CIV	1*	47, XY, +21
Cefalocele	1*	
Meningocele	1*	
Cisto de plexo coróide, dilatação da cisterna magna	1*	47, XX, +18
Hipoplasia cardíaca (ventricular E)	1*	47, XY, +18
Lesão obstrutiva do trato urinário	1*	
Agenesia do fêmur + encurtamento contra-lateral	1	
Total	24	5

HCPA/Setor de Medicina Fetal/1993-1995/JAM.

Tabela 4. Valor preditivo positivo para trissomias em relação à espessura da medida da translucência nucal

Translucência nucal (mm)	Valor preditivo positivo(%)
3	13
4	57
5	80

Nicolaidis, 1993.

Além das trissomias, pode rastrear também síndrome de Turner, triploidia, e outras anomalias cromossômicas.

Defeitos cardíacos, hérnia diafragmática, onfalocele, malformações esqueléticas, anomalias renais, uropatia obstrutiva, e diversas doenças gênicas já foram descritas em associação à translucência nucal aumentada em fetos com cariótipo normal (19,20).

A medida da translucência nucal está sendo oferecida às nossas pacientes. Estamos desenvolvendo um estudo para avaliar o desempenho deste exame em diferentes situações de risco para anomalia fetal.

Ecocardiografia fetal

A ecocardiografia fetal, iniciada no final da década de 70, permite identificar a maioria das

anomalias cardíacas estruturais graves e dos distúrbios do ritmo cardíaco após as 18-20 semanas de gestação, permitindo o tratamento intra-útero das arritmias, o encaminhamento das malformações cardíacas graves para hospitais especializados e o aconselhamento familiar (21, 22).

Um exame ecocardiográfico fetal normal tranqüiliza uma família com fatores de risco para cardiopatia congênita, permitindo uma gestação mais tranqüila e mais prazerosa. O exame ecocardiográfico básico pode ser realizado em condições ótimas entre 18 e 28 semanas de gestação. Alguns defeitos anatômicos podem ser de difícil detecção no início da gravidez devido ao pequeno tamanho do feto, e um exame tardio pode ser prejudicado pelas sombras acústicas geradas pelas costelas fetais e pela diminuição do volume relativo do líquido amniótico em relação ao tamanho do feto.

A projeção de 4 câmaras possui várias características que a tornam um teste adequado de rastreamento para malformações cardíacas fetais e, por isso, faz parte do exame ultrasonográfico obstétrico porque é facilmente visualizada na projeção transversal do tórax fetal, e pode ser obtida sem nenhum treinamento especializado em ultra-sonografia (23). Além disso, pode ser visualizada em todas as posições fetais e em mais de 95% dos exames realizados após 19 semanas de gestação (24).

Sempre que as condições técnicas permitirem, as projeções das vias de saída ventriculares devem ser incluídas como parte de uma avaliação cardíaca fetal de rotina, realizada pelo obstetra. A avaliação dos grandes vasos aumenta a detecção de várias cardiopatias que podem passar despercebidas na projeção de 4 câmaras (25). Algumas malformações cardíacas podem estar presentes com uma imagem de quatro câmaras normais, como a Tetralogia de Fallot, transposição de grandes vasos, dupla via de saída de ventrículo direito, pequenos defeitos dos septos interventricular e atrial, coarctação leve da aorta (26).

É consenso na literatura que a maioria dos recém-nascidos com cardiopatia congênita não possui fatores de risco identificáveis (27). Apesar deste fato, a ecocardiografia fetal tem sido tradicionalmente indicada em gestações com presença de fatores de risco reconhecidos para malformações cardíacas. Os fatores de risco para cardiopatia congênita podem ser agrupados

em três categorias principais: fatores maternos, fatores obstétricos e fetais (28). Os fatores de risco internacionalmente utilizados como critérios de indicação para ecocardiografia fetal estão listados na tabela 5. A ecocardiografia fetal é oferecida às gestantes no HCPA, de acordo com estas indicações, preferencialmente a partir das 20 semanas de idade gestacional.

Procedimentos invasivos

A possibilidade de realizar métodos invasivos em diagnóstico pré-natal foi um grande avanço, pois viabilizou a coleta direta de material fetal para análise em laboratório, permitindo a realização de diversos exames, como o cariótipo para doenças cromossômicas, os ensaios enzimáticos para erros inatos do metabolismo e a análise molecular ainda em vida intra-útero.

Os principais procedimentos invasivos são a biópsia de vilosidades coriônicas (BVC), a amniocentese e a cordocentese. Existem outros procedimentos como punção de bexiga e punção intra-cardíaca, entretanto estes métodos não são utilizados de rotina, sendo reservados para situações especiais.

A BVC é a retirada de fragmentos de placenta através de uma agulha guiada por ultra-sonografia. A via preferencial é a transabdominal. Pode ser realizada entre 11 e 14 semanas, e tem um risco de abortamento de 1 a 1,5%. O material coletado pode ser analisado diretamente e após cultivo, sendo utilizado para estudo citogenético, ensaio enzimático e análise molecular.

A amniocentese é a retirada, por agulha, de líquido amniótico. Ela pode ser realizada com segurança a partir de 15 semanas e tem um risco de abortamento de 0,5 a 1%. Este exame também é guiado por ultra-sonografia, e o material utilizado para análise são as células fetais flutuantes no líquido, e as enzimas que o compõe.

A cordocentese é a punção de vaso umbilical para retirada de amostra de sangue fetal. Uma agulha guiada por ultra-sonografia é introduzida na cavidade amniótica e depois punciona o vaso. Este procedimento é utilizado quando a idade gestacional é avançada demais para a realização de amniocentese e na ausência de líquido amniótico. O risco de perda fetal é de 2-5%.

Tabela 5. Fatores de risco para cardiopatias congênitas

Fatores de risco materno

- Idade maior do que 35 anos
- Portar cardiopatia congênita
- Filho(s) prévio(s) com anomalias congênitas
- Diabetes durante a gestação
- Doenças do colágeno
- Exposição a teratógenos (vitamina A, álcool, quimioterapia, anticonvulsivantes, lítio, vírus, etc.)
- Uso de indometacina e/ou diclofenaco após 28 semanas de gestação

Fatores de risco obstétricos

- Oligodrâmnio
- Polidrâmnio
- Suspeita de cardiopatia fetal no ultra-som obstétrico de rotina

Fatores de risco fetais

- Malformações extracardíacas
- Translucência nucal acima de 3.5 mm entre 11-13 semanas de gestação
- Déficit de crescimento intra-uterino
- Presença de cromossomopatia
- Hidropsia não-imune
- Arritmias cardíacas
- Artéria umbilical única

Adaptada de Abuhamad A (28).

A gestante poderá, dentro de até 48 horas após qualquer dos exames invasivos sofrer perda de líquido amniótico, sangramentos, e poderão ocorrer contrações. Por este motivo está indicado repouso absoluto após o procedimento, pelo menos durante o dia de realização do exame. A perda fetal é a complicação mais grave destes procedimentos.

Por todos estes procedimentos oferecerem riscos, é muito importante que ao serem indicados aos casais, estes tenham realizado previamente uma consulta de aconselhamento genético. É importante que a indicação de um procedimento invasivo seja criteriosa para não expor as pacientes a situações temerárias sem

benefício. As principais indicações para amniocentese ou coleta de vilosidades são apresentadas na tabela 6.

Diagnóstico pré-natal de cromossomopatias no HCPA

Acima de 50% das anomalias congênitas são de causa desconhecida e 6% são devidas a causas cromossômicas (29). Entre 5,6 e 11,5% das mortes perinatais estão associadas a anormalidades cromossômicas (30). Considerando-se estes relevantes dados, a partir dos anos 70, o diagnóstico pré-natal das anormalidades cromossômicas tem sido utilizado

Tabela 6. Indicações para procedimentos invasivos no diagnóstico pré-natal.

Idade materna avançada ^a
História familiar de cromossomopatia
Pais portadores de alterações cromossômicas
Filho anterior polimalformado falecido sem diagnóstico
História familiar de Erro Inato de Metabolismo
História familiar de doenças gênicas que tenham testes moleculares definidos para diagnóstico pré-natal
Anomalias na ultra-sonografia
Triagem materna alterada

^aNo HCPA, usamos o critério de 38 anos de idade na data provável do parto para a indicação de exame.

como um procedimento diagnóstico formal (1).

A amniocentese tradicional, por definição, é a remoção de líquido amniótico por aspiração do saco gestacional (31). Com o auxílio da ultra-sonografia é retirado de 20 a 30 ml de líquido amniótico. Na própria seringa da coleta, o material é levado ao laboratório, centrifugado e ao decantado de células fetais se adiciona meio de cultura, e ambos são transferidos para um frasco de cultura celular. Os frascos são mantidos em estufa de CO₂ a 37°C, durante o período de multiplicação celular, que leva em torno de 10 dias. O meio de cultura é trocado 3 vezes por semana, quando também é acompanhado o crescimento celular ao microscópio invertido. Quando as células estão confluentes e o crescimento celular atinge o nível desejado, as células dos frascos de cultura são colhidas e passam por um processo de hipotonia e posterior fixação. O material fixado é então pingado em lâminas que passam pelo processo de bandeamento GTG e são posteriormente coradas com Giemsa. As metáfases das lâminas são analisadas ao microscópio e o cariótipo é definido.

Resultados

O diagnóstico pré-natal de cromossomopatias surgiu no HCPA pela necessidade de atender às nossas pacientes, que, pelos diversos motivos já citados, procuravam o serviço de genética para o

acompanhamento de gestações de alto risco. Nos países desenvolvidos este tipo de diagnóstico já era fortemente difundido desde a década de 80. Iniciamos então, em nível experimental, no final de 1988, as primeiras tentativas. As condições não eram as mais adequadas para um trabalho tão requintado, e que exigia uma área de trabalho totalmente estéril e materiais de primeira linha. Após superados os obstáculos iniciais, a atual taxa de sucesso de crescimento das culturas atinge em torno de 98%, uma taxa semelhante aos países desenvolvidos.

Durante estes 13 anos de trabalho, 613 gestações foram diagnosticadas através do cariótipo e dentre estes, 38 foram alterados (6,2%). A tabela 7 especifica os nossos resultados, salientando que as anomalias cromossômicas foram mais frequentes quando malformações fetais eram detectadas na ecografia (60,5% dos casos alterados).

Técnicas moleculares para detecção de cromossomopatias

1. Fish (Fluorescence *in situ* hibridization): Esta técnica é o produto da combinação da citogenética tradicional e da biologia molecular, que iniciou na década de 80 em alguns laboratórios selecionados do primeiro mundo, e teve grande aplicabilidade no diagnóstico clínico. Ela permite que sequências de DNA sejam detectadas em metáfases ou em núcleos interfásicos na própria lâmina. Isto é, não há extração de DNA, ele é

Tabela 7: Relação entre a indicação do cariótipo fetal e as alterações cromossômicas identificadas.

Cromossomopatias	Indicação	n (%)
47,—, +21	Malformação na Ecografia	07
	Idade Materna Avançada	06
Total		13 (34.2%)
47,—,+ 18	Malformação na Ecografia	11
	Idade Materna Avançada	02
Total		13 (34.2%)
Translocação Balanceada	Pais com a mesma alteração	05 (13.2%)
Monossomia do X	Higroma cístico, HFNI*	03 (7.9%)
Deleção 4p-	Filho anterior com a mesma	01 (2.6%)
47,XXY	Pai exposto a radiação (?)	01 (2.6%)
47,—,+ marcador	Malformações na ecografia	01 (2.6%)
47,—,+ 13	Malformações na ecografia	01 (2.6%)
		38 (100%)
Total de alterações		

* HFNI- Hidropsia Fetal não imune

estudado diretamente no núcleo ou no cromossomo. Tanto o DNA alvo como a sonda marcada com material fluorescente são denaturados (a dupla hélice abre com o calor). A sonda e o DNA alvo hibridizam. Com um microscópio de fluorescência e filtros adequados se pode visualizar as sequências marcadas e hibridizadas. A grande vantagem desta técnica é que em 24 horas se pode ter o diagnóstico prévio de algumas cromossomopatias, como trissomias do 13, 18 e 21, bem como de cromossomos sexuais. A detecção apenas destas alterações abrange 90% das cromossomopatias. Para as gestantes que normalmente são ansiosas ou de risco, isto é de grande valor;

2. PCR (*Polimerase chain reaction*): Este também é um método molecular e alternativo para detecção das cromossomopatias mais comuns (13, 18, 21 e cromossomos sexuais), e se baseia em uma técnica amplamente difundida que é a PCR, que com a amplificação de pequenas sequências de DNA (*STRs- polymorphic small tandem repeats*) permite se obter o diagnóstico em algumas horas.

No momento, nenhuma destas técnicas de citogenética molecular está disponível no HCPA para o diagnóstico pré-natal, e sua implantação está em fase de planejamento.

Pesquisa de erros inatos do metabolismo

No grupo dos erros inatos do metabolismo (EIM), onde a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de se ter um novo filho afetado é de 25%; já nas situações de herança ligada ao X, há 50% de chance de se ter filhos homens afetados. No momento em que se tem o diagnóstico de uma criança doente, é necessário realizar o aconselhamento genético com a finalidade de informar sobre os riscos de recorrência, o prognóstico e a gravidade da doença em estudo e a possibilidade de realização de DPN. Para os casais em risco, o DPN é uma opção reprodutiva, pois permite o nascimento de crianças normais e ajuda a tranquilizar e a reduzir a ansiedade associada à gestação, principalmente naquelas situações em que o prognóstico é grave e sem a possibilidade de um tratamento eficaz.

O DPN para erros inatos do metabolismo (EIM) é altamente específico, e é realizado de forma acurada naquelas famílias em que o diagnóstico de uma doença metabólica já está bem estabelecido no caso índice (através de estudo bioquímico e/ou molecular), ou nos casos de identificação prévia de um casal de heterozigotos (ou heterozigota de doença ligada ao X). Algumas desordens metabólicas, especialmente as doenças lisossômicas de depósito (DLD), têm sido relacionadas com hidropsia fetal não-imune, ascite fetal e translucência nucal aumentada (32, 33). Nesses casos, também se pode fazer uma investigação pré-natal mas, ao contrário das situações anteriores, onde a investigação é bem específica e direcionada, esta será realizada de forma sistematizada e ampla, na tentativa de averiguar qual destas causas pode estar relacionada com esse tipo de manifestação período pré-natal.

O DPN das doenças metabólicas se tornou realidade na prática médica no final dos anos 60 e início dos anos 70, com o advento da amniocentese e a cultura de células amnióticas, que foi concomitante à descoberta de que os defeitos enzimáticos eram expressados em fibroblastos. Somente 10 anos depois é que se difundiu o uso de vilosidades coriônicas na investigação de doenças metabólicas (33, 34).

Para o DPN de EIM estão disponíveis uma variedade de procedimentos que podem ser realizados em diferentes períodos gestacionais. A BVC é o procedimento de preferência na maioria dos EIM, pois é realizado mais precocemente e permite a análise enzimática, morfológica e/ou molecular, tanto no exame direto deste tecido, como no material cultivado, disponibilizando um resultado inicial para a paciente dentro de 1 a 3 dias após a coleta. Na amniocentese, o líquido amniótico permite uma análise no sobrenadante, onde se pode investigar a presença de metabólitos acumulados e até a atividade de algumas enzimas (dependendo da doença em questão); nas células cultivadas, podem ser realizados ensaios enzimáticos ou pesquisa de mutações por análise molecular. É conveniente salientar que o líquido amniótico fornece resultados provavelmente dentro de 2 a 3 semanas após a coleta. Já a cordocentese geralmente é indicada, no caso dos EIM, em situações que a idade gestacional está bem

avançada na época do DPN. Utiliza-se este material para análise bioquímica, pesquisando a atividade enzimática em plasma ou leucócitos, ou análise molecular. Este procedimento, embora seja realizado em um período mais tardio, a partir da 20ª semana, fornece resultados rápidos por não envolver cultivo de células.

No DPN de doenças metabólicas, a escolha do procedimento adequado para a investigação leva em conta o alto índice de recorrência envolvido nas novas gestações, a idade gestacional no período da avaliação e a doença em risco. Por um lado, o uso de vilosidades coriônicas é preferível por fornecer um resultado mais precoce, permitindo a confirmação caso este seja positivo (35), embora seja descrita uma maior chance de perda fetal e a possibilidade de contaminação com o material materno, fatos que estão diretamente relacionados com a experiência dos profissionais envolvidos (36). Por outro lado, existem doenças como a Mucopolissacaridose tipo I, por exemplo, em que a atividade enzimática da α -iduronidase em vilosidades coriônicas é particularmente baixa, preferindo-se neste caso o uso de líquido amniótico onde a atividade desta enzima é mais elevada (33).

Atualmente, é defendida a realização do DPN da forma mais completa possível a fim de se ter um resultado mais acurado, combinando-se a análise bioquímica (identificação de metabólitos e medida da atividade enzimática) e molecular, através de análise direta da mutação ou estudo de polimorfismos do DNA (33, 37).

Existem situações que merecem cuidados maiores, como é o caso das pseudodeficiências (32, 38), onde há baixa atividade enzimática *in vitro* sem que haja comprometimento clínico. Nestas circunstâncias, é necessário análise de mutações e ensaios enzimáticos não só no caso índice, como também nos pais, antes da realização do DPN.

O Serviço de Genética Médica realiza DPN para DLD desde 1988. É um centro de referência na investigação deste grupo de doenças, uma vez que as DLD contribuem com mais de 50% dos EIM diagnosticados neste serviço, e por disponibilizar a maioria dos ensaios enzimáticos correspondentes ao grupo de DLD até agora descritos.

A tabela 8 mostra o número de DPN realizados, as doenças investigadas e o material

utilizado nos diferentes casos. Naqueles casos investigados pela presença de um filho anterior com doença metabólica foram detectados 16 afetados em 63 estudados, correspondendo a 25,3% dos casos, compatível com o esperado pelo padrão de herança recessivo.

Análise molecular

A análise molecular pode ser útil no DPN de doenças que não apresentem outros meios diagnósticos como síndrome do X-frágil, anemia falciforme e fibrose cística. No caso de doenças em que é possível uma análise bioquímica, como na maioria dos erros inatos do metabolismo por exemplo, a análise molecular pode auxiliar na confirmação do diagnóstico bioquímico, porém dificilmente irá substituí-lo. Ainda assim, em casos em que há suspeita de pseudodeficiência, a análise molecular deve acompanhar a análise

bioquímica. No futuro, a principal aplicação da biologia molecular ao DPN será para a realização de diagnóstico pré-implantação.

A maior dificuldade da aplicação das técnicas de biologia molecular ao diagnóstico pré-natal é a necessidade de conhecimento prévio das mutações presentes na família. Nas doenças em que há uma mutação comum, como fibrose cística, ou as causadas por expansões de trinucleotídeos, é possível estabelecer protocolos de investigação aplicáveis ao DPN. Entretanto, na maioria das doenças genéticas, as mutações são raras e a falta de informação sobre a mutação presente em um ou ambos os pais impede a realização do teste. Mesmo a análise completa do gene no familiar afetado pode não ser suficiente, uma vez que é difícil, especialmente no caso das famílias com mutações privadas, manter um protocolo disponível para a realização

Tabela 8. Diagnósticos pré-natais de EIM realizados no Serviço de Genética Médica entre 1988 e 2001

Doenças	Gestações	Afetados	Material		
			Vilo corial	Líquido amniótico	Sangue fetal
Gangliosidose GM1	26	6	22	4	-
Gangliosidose GM2	10	3	7	2	1
Mucopolissacaridose. I	7	1	4	3	-
Leuc. Metacromática	7	2	7	-	-
D. Gaucher	6		2	3	1
D. Krabbe	2	1	1	1	-
Niemann-Pick B	3	2	1	2	-
Def. Mult. de Sulfatase	1	0	1	-	-
MPS IVA	2	1	-	2	-
MPS IIIB	1	0	-	1	-
Outras indicações					
Hidropsia fetal	19	1	-	15	4
Ascite	1	0	-	1	-
TN aumentada	1	0	-	1	-
Total	86	17	45	35	6

do teste. Uma alternativa nestes casos é a realização de testes indiretos, utilizando análise de ligação através de análise de marcadores intragênicos ou próximos ao gene em questão. No entanto, estes testes, apesar de generalizáveis para a maioria dos pacientes, apresentam resultados que indicam apenas a probabilidade de o feto ter ou não herdado a doença, ao contrário dos testes diretos que fornecem resultados de certeza.

Outra alternativa é o estabelecimento de testes completos para um número reduzido de doenças, preferencialmente aquelas na qual o laboratório tem maior experiência, constituindo-se assim em um centro de referência para estas enfermidades.

O Laboratório de Biologia Molecular do SGM-HCPA tem realizado análise molecular em pacientes com diferentes erros inatos do metabolismo, e dos 4 testes pré-natais feitos desde 1996, um foi para Mucopolissacaridose tipo I, dois para Mucopolissacaridose tipo II e um para Gangliosidose GM1 (Leistner, 2001 – comunicação pessoal). No entanto, já há disponibilidade técnica para a realização de um número maior de exames para outras doenças genéticas.

Conclusões

Aspectos éticos

A discussão dos aspectos éticos do DPN passa, inevitavelmente, pela questão das atitudes a serem tomadas frente a um resultado anormal. Em vários países, é legalmente permitido terminar a gestação de fetos afetados por doenças genéticas graves. No Brasil, a interrupção da gestação por este motivo não é permitida por lei, apesar de serem cada vez mais frequentes liminares judiciais permitindo a interrupção da gestação no caso de malformações graves. Paradoxalmente, apesar de toda a discussão em relação à possibilidade de interrupção da gestação, o fato é que o DPN tem contribuído significativamente para a diminuição dos abortos em famílias de risco, já que a maioria dos testes diagnostica fetos normais (39). Assim, existem menos abortos de fetos não afetados e mais crianças desejadas estão nascendo de casais em risco (40).

O dilema entre permitir ou não a interrupção

da gestação de um feto afetado depende de considerações sobre o *status* moral do feto, crenças religiosas, posição quanto ao valor absoluto da vida e avaliação da qualidade de vida dos indivíduos afetados pela doença em questão. Quanto a este último ponto, é preciso ressaltar que o conceito de qualidade de vida é extremamente variável e está ligado à capacidade de suporte social para manter a criança. Por outro lado, é preciso garantir que o fato de se poder evitar o nascimento de crianças com alguma deficiência não influencie a posição da sociedade frente a indivíduos deficientes, incluindo a capacidade da aceitação de diferenças (41). Da mesma forma, não deve haver pressão social sobre as decisões tomadas pelo casal, tanto no sentido de interromper como no de continuar a gestação de um feto afetado.

Deve haver um balanço no sentido de que as mulheres tenham informação suficiente sobre o serviço mas não se sintam pressionadas a utilizá-lo, pois assim como pode trazer esclarecimentos importantes para o casal, o DPN também pode ser motivo de grande ansiedade (42). Da mesma forma, deve-se evitar a realização de procedimentos sem uma indicação consistente, motivados apenas por ansiedade materna. O surgimento de exames menos invasivos, e por isso oferecidos quase como rotina a um maior número de gestantes, como o triplo teste fetal e a medida da translucência nugal, faz com que um grande número de pessoas sejam testadas apenas para se assegurarem que terão uma gestação normal (41). Entretanto, há o risco de que essas pessoas não estejam recebendo um aconselhamento genético adequado prévio à realização do teste, tornando difícil lidar com um eventual resultado alterado. Isso ocorre mesmo em casais em risco para uma doença genética, especialmente porque cerca de 95% dos resultados são normais. Por este motivo, o aconselhamento genético prévio a todos os testes pré-natais deveria incluir uma descrição do pior cenário, para que os pacientes, uma vez informados de todas as possibilidades e implicações tenham condições de decidir se querem ou não realizar os testes (41).

Em resumo, a realização do DPN acompanhado de aconselhamento genético adequado e garantido o suporte dos profissionais de saúde à decisão do casal é eticamente aceitável,

ainda que possa gerar dilemas éticos. Outros princípios, comuns aos testes genéticos em geral, são também aplicáveis como o respeito à autonomia dos pacientes, previsto no caráter voluntário da realização dos testes e o respeito às decisões do casal, além de garantias quanto à confidencialidade das informações (43). Além disso, é importante ressaltar que as decisões éticas e morais devem ser tomadas pela família e nunca impostas pelo médico ou pela sociedade (44).

Perspectivas para o futuro

Diagnóstico genético pré-implantação

O diagnóstico genético pré-implantação (DPI) é uma forma de diagnóstico pré-natal, combinando técnicas de fertilização *in vitro* e biologia molecular, onde as células de cada embrião são examinadas para a detecção da presença ou não de uma desordem genética antes da transferência embrionária e da ocorrência da gestação. A retirada de células para a análise pode ser realizada em diversas etapas embrionárias, como oócitos, embriões de 8 células ou blastocistos, e é realizada através de uma biópsia muito cuidadosa. FISH e PCR são as técnicas utilizadas na análise genética, sendo que a primeira é utilizada para determinar doenças cromossômicas e a última para detecção de doenças gênicas. Ambas as técnicas foram modificadas para serem aplicadas em uma célula única com eficácia e acurácia bastante aumentadas. As células saudáveis são transferidas novamente para o útero materno. A aplicabilidade do DPI ainda é limitada em todo o mundo, devido às dificuldades técnicas envolvidas

Terapia fetal

O desenvolvimento de métodos para diagnóstico pré-natal foi de real importância no aconselhamento genético de gestações de risco. Apesar disto, atualmente, não se pode oferecer muito ao feto, a não ser um atendimento especializado e preparado para alguma urgência ao seu nascimento. Para a família também não há muito a oferecer, exceto o abortamento de uma gestação anormal.

Entretanto, há um esforço científico em busca de tratamentos intra-útero, que junto à grande capacidade de regeneração do tecido fetal, poderá ser uma revolução. Atualmente, já

existe tratamento com sucesso para arritmias cardíacas, através da administração de fármacos antiarrítmicos (como a digoxina) para a mãe, que atingem o feto por via transplacentária (45, 46). Outros tratamentos que estão em estudo são a administração de dexametasona para a gestante para terapia de hiperplasia adrenal congênita (47), o transplante intra-útero de células tronco hematopoiéticas (*stem cells*) para o tratamento de síndromes de imunodeficiência e b-talassemias (48), que já demonstrou resultados positivos.

Um procedimento que esteve muito em moda e que os estudos demonstraram que não havia uma boa sobrevida fetal, foram as cirurgias fetais a céu-aberto para correção de defeitos congênitos, como meningomielocoele, hérnia diafragmática, teratoma sacrococcígeo e obstruções urinárias. A maior complicação destes procedimentos é a alta taxa de partos prematuros. A principal novidade neste campo são os estudos em animais de cirurgia endoscópica, que parecem diminuir muito o risco de indução de parto e o estresse fetal cirúrgico. A principal terapia cirúrgica realizada atualmente é a coagulação a *laser* de vasos da placenta em gestações gemelares com a síndrome de transfusão feto-fetal, com taxas de sobrevida em torno de 55% (49).

A experiência no HCPA é limitada ao tratamento das arritmias cardíacas. Outros procedimentos devem ter sua eficácia e segurança comprovadas antes da aplicação clínica.

Terapia gênica

A terapia gênica surgiu no início da década de 90 como uma proposta de cura de doenças genéticas. Muitas pesquisas ainda deverão ocorrer até que os protocolos estejam disponíveis para aplicação em grande escala. No futuro, se pode prever que a identificação pré-natal de uma doença genética permitirá seu tratamento por terapia gênica logo após o nascimento, antes que os sintomas clínicos se manifestem ou agravem e antes que ocorram lesões irreversíveis. Entretanto, não se pode prever o tratamento ou a prevenção de manifestações que ocorrem intra-útero, uma vez que protocolos de terapia gênica intra-uterina são considerados inaceitáveis do ponto de vista ético pelo risco de transferência gênica para as células germinativas.

O diagnóstico pré-natal é um importante recurso para as famílias com risco de anomalia fetal, permitindo a opção pelo nascimento de uma criança normal. O HCPA já oferece grande parte das técnicas atualmente disponíveis para DPN, dentro de um programa multidisciplinar de Diagnóstico Pré-natal, vinculado ao Grupo de Medicina Fetal do HCPA.

Novas técnicas estão em fase de implantação, como a citogenética molecular. Perspectivas interessantes, como o diagnóstico pré-implantação e a terapia gênica, estão em fase de estudos, e poderão contribuir ainda mais para o atendimento dessas famílias.

Referências

- Milunsky A, Milunsky J. Genetic Counseling: Preconception, Prenatal, and Perinatal. In: Milunsky A, editor. *Genetic Disorders and The Fetus*. 4th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1998. p.1-52.
- Pyeritz RE. Medical Diagnosis. In: Tierney Jr. LM, McPhee SJ, Papadakis MA, editors. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 39th ed. New York; 2000. p. 1574-97.
- Harper PS. *Practical Genetic Counselling*, 3rd ed. Londres: Ed. Wrigt; 1988.
- Rubin SP, Malin J, Maidman J. Genetic Counseling before prenatal diagnosis for advanced maternal age: An important medical safeguard. *Obstet Gynecol* 62:155. In: *Genetic Disorders and The Fetus*. The Johns Hopkins University Press, 4th ed. 1998, p.1-52.
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of medical research council vitamin study. *Lancet* 1991;228:131.
- Waurin J. Genetic Counseling: Prenatal Counseling of an Abnormal Finding. *The Journal of the Association of Genetic Technologists* 1998; 24(3):81-3.
- Grobstein R. Amniocentesis counseling. In: Kessler S, editor. *Genetics counseling: psychological dimensions*. New York: Academic Press; 1979. p.107-13.
- American College of Medical Genetics. Statement on multiple marker screening in pregnant women. *Newsletter* 1994;2.
- Haddow JE, Kloza EM, Smith, DE, Knight GJ. Data from an alpha-protein pilot screening program in Maine. *Obstet Gynecol* 1983;62:556-60.
- Mercatz IR, Nitowsky HM, Maeri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:886-94.
- Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman risk of having a pregnancy associate with Down's Syndrome using her age and serum alpha fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:387-402.12.
- Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancy program in Maine. *Obstet Gynecol* 1987;62:556-60.13.
- Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988;297:883-7.
- Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, Williams J, Miller WA, Johnson A. Screening of maternal serum for fetal Down's Syndrome in the first trimester. *N Engl J Med* 1998;338:955-61.
- Cuckle H. Calculating correct Down's syndrome risks. *Br J Obst Gynaecol* 1999;106: 371-2.
- Maestri D, Sanseverino MTV, Cheinquer MCM, Kessler RG, Magalhães JAA. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. *Rev Ass Med Brasil* 1988;44(4):273-6.
- Fonseca MMC, Magalhães JAA, Papich H, Dias R, Schmidt A. Ultra-sonografia em obstetrícia: explorando um mundo novo. A relação pais-bebê – da observação à clínica. In: Caron NA, editor. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2000.
- Nicolaidis KH, Azar G, Byrne D, et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening defects in first trimester of pregnancy. *Br Med J* 1992;304:867-9.
- Souka AP, Krampfl S, Bakalis V, Heath V, Nicolaidis KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal tranlucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18:9-17.
- Hippala A, Eronen M, Taipale P, Salonen R, Hilesmaa V. Fetal nuchal translucency and normal chromosomes: a long-term follow-up study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:18-22.
- Fesslova V, Nava S, Villa L. Evolution and long term outcome in cases with fetal diagnosis of congenital heart disease: Italian multicenter study. *Fetal Cardiology Study Group of the Italian Society of Pediatric Cardiology. Heart* 1999;82(5):594.
- Simpson JM, Milburn A, Yates RW, et al. Outcome

- of intermittent tachyarrhythmias in the fetus. *Pediatric Cardiology* 1997;18:78.
23. Copel JA, Pilu G, Green J, et al. Fetal echocardiographic screening for congenital heart disease: the importance of the four chamber view. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 1987;157:648.
 24. Allan LD, Sharland G, Cook. *Atlas colorido de Cardiologia fetal*. Livraria e editora Revinter Ltda para língua portuguesa; 1997.
 25. Rabih C. Screening for fetal heart defects. *Diploma in Fetal Medicine*. The Fetal Medicine Foundation. Nicolaidis K, Romero R, Ville Y. 1999.
 26. Rabih C. Color Doppler sonography in the assesment of the fetal heart. *Diploma in Fetal Medicine*. The Fetal Medicine Foundation. Nicolaidis K, Romero R, Ville Y. 1999, 12:17.
 27. Achiron R, Glaser J, Gelener I, et al. Extended fetal echocardiography examination for detecting cardiac malformations in low-risk pregnancies. *British Medical Journal* 1992;11:345.
 28. Abuhamad A. *A practical guide to fetal echocardiography*. New York: Lippincott-Raven;1997.
 29. Kalter H, Warkany. Congenital malformations. *N Engl J Med* 1983;308:424-31/491-7.
 30. Alberman ED, Creasy MR. Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. *J Med Genet* 1977;14:313.
 31. Wilson RD. Early amniocentesis: a clinical review. *Pren Diagn* 1995;15:1259-73.
 32. Gilan JE, Lowden JA, Gaskin K, Cutz E. Congenital ascites as a presenting sign of lysosomal storage disease. *J Pediatr* 1984;104(2):225-31.
 33. Lake BD, Young EP, Winchester BG. Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases. *Brain Pathol* 1998;8:133-49.
 34. Mathieu M. Prenatal diagnosis of genetic diseases in France. *Ann Pharm Fr* 1999; 57(5):380-4.
 35. Poenaru L., Belon JP, Besancon AM, Dreyfus JC. Early prenatal diagnosis of lysosomal enzymopathies from biopsies of trophoblasts. *Ann Med Interne (Paris)* 1985;136(5):409-11.
 36. Besley GTN, Young E, Fensom AH, Cooper A. First trimester diagnosis of inherited metabolic disease: experience in UK. *J Inher Met Dis* 1991;14:129-33.
 37. Kamoun PP, Chadefaux B. Eleventh week amniocentesis for prenatal diagnosis of some metabolic diseases. *Prenat Diag* 1991;11(9):691-6.
 38. Thomaz GH. Pseudodeficiencies of lysosomal hydrolases. *Am J Hum Gen* 1994;54:934-40.
 39. Zatz, M. Dilemas éticos do mapeamento genético. *Revista USP* 1994;24:20-7.
 40. Fletcher JC, Evans M. Ethics in Reproductive Genetics *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1992; 35(4):763-782.
 41. British Medical Association. *Human Genetics: choice and responsibility*. Oxford: Oxford University Press; 1998.
 42. National Institute of Health Workshop Statement. Reproductive genetic testing: impact on women. *American Journal of Human Genetics* 1992;51:1161-3.
 43. Johnson S, Elkins TE. Ethical issues in prenatal diagnosis clinical obstetrics and gynecology 1988;31(2):408-17.
 44. Annas GJ, Elias S. Legal and Ethical Implications of Fetal Diagnosis and Gene Therapy. *American Journal of Medical Genetics* 1990;35:215-8.
 45. Brackley KJ, Ismail KM, Wright JG, Kilby MD. The resolution of fetal hydrops using combined maternal digoxin and dexamethasone therapy in a case of isolated complete heart block at 30 weeks gestation. *Fetal Diagn Ther* 2000;15(6):355-8.
 46. Won HS, Lee IS, Yoo HK, Yoo SJ, Ko JK, Lee PR, et al. Two cases of atrial flutter with fetal hydrops: successful fetal drug therapy. *J Korean Med Sci* 1998;13(6):676-9.
 47. Miller WL. Dexamethasone treatment of congenital adrenal hyperplasia in utero: an experimental therapy of unproven safety. *J Urol* 1999;162(2):537-40.
 48. Pschera H. Stem cells therapy in utero. *J Perinat Med* 2000;28(5):346-54.
 49. Deprest JA, Lerut TE, Vandenberghe K. Operative fetoscopy: new perspective in fetal therapy? *Prenat Diagn* 1997;17(13):1247-60.