

Flora Troina Maraslis

**AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO EM GESTAÇÕES QUE APRESENTAM
MALFORMAÇÕES FETAIS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.
Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner
Maluf

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Maraslis, Flora Troina

Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo em gestações que apresentam malformações fetais / Flora Troina Maraslis ; orientador, Sharbel Weidner Maluf, 2018.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Instabilidade genômica. 3. Estresse oxidativo. 4. Malformação Fetal. 5. Gestação. I. Maluf, Sharbel Weidner. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Flora Troina Maraslis

**AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO EM GESTAÇÕES QUE APRESENTAM
MALFORMAÇÕES FETAIS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Farmácia

Florianópolis, 21 de março de 2018.

Prof^ª. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr^ª.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Sharbel Weidner Maluf, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Juliana da Silva, Dr.
Universidade Luterana do Brasil

Dedicado aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às voluntárias que participaram deste projeto, sem elas a elaboração desta dissertação não seria possível.

Aos médicos Mário Júlio Franco, Roberto Noya Galuzzo e Karine Souza da Correggio por acolherem a ideia do projeto e colaborarem com a coleta de amostras de líquido amniótico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf que aceitou me orientar na realização deste trabalho.

Aos meus pais - Sinara e Anastas - irmão - Gabriel - e namorado - David - pelo apoio, carinho e força.

À equipe do setor de genética do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário (HU) pelo ensinamento e auxílio na realização das análises. Agradeço a Carolina Hilgert Jacobsen Pereira pelo ensinamento das técnicas e a estagiária Kamylla Pinheiro pelo auxílio e disposição sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) e dos outros programas de pós-graduação da UFSC que compartilharam seu conhecimento através das disciplinas ofertadas.

Aos colegas e professoras – Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) e Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatia (LOEH) - pelo uso dos equipamentos e estrutura laboratorial.

À Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza e Dr. Eduardo Benedetti Parisotto pela parceria com seu laboratório para as análises de estresse oxidativo.

Ao Prof. Dr. Roberto de Melo Ferreira supervisor de estágio de docência e a Prof.^a Dr.^a Beatriz Garcia Mendes Borba por me permitir acompanhar as aulas práticas da disciplina. Agradeço o aprendizado.

A todos os funcionários do HU que auxiliaram de alguma forma na realização deste trabalho e à instituição em si, que com sua estrutura de atendimento diversificada aos pacientes possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFSC).

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR).

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de mestrado.

RESUMO

Estima-se que em cada 33 nascimentos, um recém-nascido apresenta malformação congênita no mundo. E, a cada ano, 303000 destes morrem nas primeiras quatro semanas de vida. No Brasil e na região Sul do país, a malformação congênita é a principal causa de mortalidade pós-neonatal, com aproximadamente 50% das malformações congênitas sem uma causa específica conhecida. Muitas doenças resultam da interação entre fatores genéticos e ambientais. A instabilidade genômica, tendência aumentada do genoma em adquirir mutações, pode resultar da interação destes diferentes fatores. O excesso de espécies reativas de oxigênio pode causar dano em diferentes componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA. O estresse oxidativo, desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes em favor das primeiras, pode ser alterado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e/ou espécies reativas de nitrogênio, ou por uma diminuição nos mecanismos de defesa antioxidante. A gestação apresenta maior susceptibilidade ao estresse oxidativo que, uma vez estabelecido em períodos críticos do desenvolvimento embrionário, pode levar a modificações na expressão gênica, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da malformação congênita. O presente trabalho avaliou o estresse oxidativo e a instabilidade genômica no sangue periférico de gestantes com malformação fetal (n = 32), gestantes (n = 35) e mulheres não gestantes (n = 34). Para avaliar o estresse oxidativo, foi realizado o teste de proteína carbonilada (PC), o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a avaliação da atividade da enzima catalase (CAT). Para avaliar a instabilidade genômica, foram realizados o ensaio cometa e o ensaio de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular - citoma (CBMN - citoma), que permite a análise das frequências de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPB) e *buds* nucleares (NBUD), além de possibilitar o cálculo do índice mitótico (IDN). Avaliou-se também o estado inflamatório através do ensaio de mieloperoxidase (MPO). O cariótipo fetal e a dosagem de alfafetoproteína (AFP) foram utilizados em combinação com a ultrassonografia, permitindo o diagnóstico da malformação fetal. Foi observado um aumento de PC e MN nas gestantes em relação às mulheres não gestantes, principalmente no terceiro trimestre gestacional. Quanto às gestantes com malformação fetal, as gestantes de segundo trimestre apresentaram análises semelhantes às do mesmo período gestacional do grupo de gestantes. As gestantes com

malformação fetal no terceiro trimestre gestacional apresentaram redução de PC, NPB e CAT em comparação com o mesmo período gestacional do grupo de gestantes. As gestantes com fetos com cariótipo alterado apresentaram aumento de NBUD, NPB, MPO e idade, e diminuição do IDN em comparação às gestantes com fetos com cariótipo normal. Essas alterações foram induzidas principalmente por gestantes com fetos com síndrome de Down. Considerando a amostra completa, as participantes que costumam tomar café diariamente apresentaram frequência de NBUD aumentada em comparação com aquelas que não bebiam café ou não possuíam esse hábito diário. A gestação é um processo fisiológico que pode levar a alterações nos marcadores de estresse oxidativo e instabilidade genômica em comparação com mulheres não gestantes.

Palavras-chave: Dano de DNA. Ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese celular - citoma. Ensaio do Cometa. Espécies reativas de oxigênio. Gestação. Malformação fetal.

ABSTRACT

An estimated one in 33 newborns born with congenital malformation worldwide. And each year, 303,000 of them die within the first four weeks of life. In Brazil and in the southern region, congenital malformation is the main cause of post-neonatal mortality, with approximately 50% of congenital malformations without a specific known cause. Many diseases result from the interaction between genetic and environmental factors. Genomic instability, an increased tendency of genome to acquire mutations, may result from the interaction of these different factors. Excessive reactive oxygen species (ROS) can cause damage to different cellular components such as lipids, proteins and DNA. Oxidative stress, an imbalance between pro-oxidant and antioxidant molecules in favor of the former, can be altered by reactive oxygen species (ROS) and/ or reactive nitrogen species increase, or by a decrease in antioxidant defense mechanisms. Gestation presents greater susceptibility to oxidative stress, which, once established in critical periods of embryonic development, can lead to modifications of gene expression, suggesting the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of congenital malformation. The present study evaluated the oxidative stress and genomic instability in the peripheral blood of pregnant women with fetal malformation (n = 32), pregnant women (n = 35) and non-pregnant women (n = 34). To evaluate oxidative stress, carbonylated protein test (CP), thiobarbituric acid reactive substances test (TBARS) and evaluation of catalase enzyme activity (CAT) were performed. To evaluate genomic instability, comet assay and cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN cyt) were performed. CBMN cyt allows the analysis of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPB) and nuclear buds (NBUD) frequencies, besides the mitotic index calculation (NDI). The inflammatory state was also assessed by the myeloperoxidase assay (MPO). The fetal karyotype and the alpha-fetoprotein (AFP) dosage were used with ultrasonographic image to allow the fetal malformation diagnosis. CP and MN were increased in pregnant women compared to non-pregnant women, especially in the third trimester of pregnancy. As for pregnant women with fetal malformation, second-trimester pregnant women presented similar analyzes to the same gestational period as the pregnant women with fetal malformation. Pregnant women with fetal malformations in the third trimester presented a reduction of CP, NPB and CAT in comparison with the same gestational period of the pregnant woman group. Pregnant women with altered fetal karyotypes

had increased NBUD, NPB, MPO and age, and decreased NDI compared to pregnant women with normal karyotype fetuses. These alterations were induced mainly in pregnant women with fetuses with Down syndrome. Considering the whole sample, participants who consumed coffee daily had increased NBUD frequency compared to those who did not drink coffee or did not have this daily habit. Gestation is a physiological process that can lead to changes in oxidative stress and genomic instability markers compared to non-pregnant women.

Keywords: DNA damage. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Comet assay. Reactive oxygen species. Pregnancy. Fetal malformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cronologia do desenvolvimento pré-natal humano da 1 ^a a 10 ^a semana.	24
Figura 2- Desenho esquemático de corte transversal de placenta madura.	27
Figura 3- Membrana placentária.	28
Figura 4- Ultrassons fetais indicando diferentes malformações congênitas.	35
Figura 5- Aberrações cromossômicas em decorrência de erros de segregação na meiose.	38
Figura 6- Coleta de líquido amniótico.	41
Figura 7- Cariótipo fetal 46,XY.	42
Figura 8- Espécies reativas.	43
Figura 9- Representação esquemática da produção de espécies reativas e principais vias enzimáticas antioxidantes celulares.	47
Figura 10- Diferentes classes de dano observadas na técnica do cometa.	50
Figura 11- Fotomicrografias de células binucleadas com diferentes alterações contadas no teste CBMN - citoma.	51
Figura 12- Diferentes destinos possíveis encontrados nas células em cultura com bloqueio da citocinese.	51
Figura 13- Esquema amostral.	56
Figura 14- Gráfico de alfafetoproteína (MoM) versus idade gestacional.	71
Figura 15- Amostras de líquido amniótico.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização da amostra.	65
Tabela 2- Características das gestações com malformação fetal em relação ao cariótipo fetal.	66
Tabela 3- Marcadores de instabilidade genômica nos grupos estudados.	67
Tabela 4- Valores dos parâmetros avaliados em relação ao cariótipo fetal.	69
Tabela 5- Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e atividade da MPO.....	70
Tabela 6- Concentrações de AFP no LA de acordo com a idade gestacional.	71
Tabela 7- Correlações entre parâmetros quantitativos considerando todas as participantes do estudo.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Alfafetoproteína
CAT	Catalase
CBMN - citoma	Micronúcleos com bloqueio de citocinese celular - citoma
CIUR	Crescimento Intra Uterino Restrito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
G	Gestantes
GMF	Gestantes com malformação fetal
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GSR	Glutathione reductase
G6PD	Glicose 6-fosfatato desidrogenase
HClO	Ácido hipocloroso
•OH	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDN	Índice de divisão nuclear
ITD	Índice total de dano
LA	Líquido amniótico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
MNG	Mulheres não gestantes
MPO	Mieloperoxidase
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBUD	<i>Buds</i> nucleares
•NO	Óxido nítrico
NPB	Pontes nucleoplasmáticas
NTD	Defeitos no fechamento do tubo neural
O ₂ •-	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PBS	Tampão fosfato salino

PC	Proteína Carbonilada
r	Coefficiente de correlação de Pearson
ρ	Rô de Spearman
RO•	Radical alcoxil
ROO•	Radical peroxil
ROOH	Hidroperóxido lipídico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Síndrome de Down
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
ST	Síndrome de Turner
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
URL	Unidades de luz relativa
8OHdA	5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina
8-OHdG	5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1	GESTAÇÃO	23
2.1.1	Embrião/ Feto.....	23
2.1.2	Placenta	23
2.2	MALFORMAÇÕES	33
2.2.1	Tipos de malformações.....	34
2.2.2	Síndromes genéticas.....	37
2.3	LÍQUIDO AMNIÓTICO.....	39
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO	42
2.5	INSTABILIDADE GENÔMICA	49
3	OBJETIVOS.....	53
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	SUJEITOS E MÉTODOS.....	55
4.1	DESENHO AMOSTRAL.....	55
4.2	COLETA DE AMOSTRAS.....	57
4.3	AVALIAÇÕES LABORATORIAIS.....	57
4.3.1	Ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular - citoma (CBMN - citoma).....	58
4.3.2	Técnica do cometa.....	59
4.3.3	Cariótipo fetal.....	60
4.3.4	Peroxidação lipídica (TBARS).....	62
4.3.5	Proteína Carbonilada (PC)	62
4.3.6	Catalase (CAT).....	63
4.3.7	Mieloperoxidase (MPO)	63
4.3.8	Alfafetoproteína (AFP).....	63
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5	RESULTADOS.....	65

5.1	PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA	65
5.2	MARCADORES DE INSTABILIDADE GENÔMICA.....	66
5.3	CARIÓTIPO FETAL.....	68
5.4	MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	68
5.5	CORRELAÇÕES.....	72
5.6	HÁBITOS DE VIDA.....	72
5.7	VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DO COMETA EM AMNIÓCITOS DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO	74
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO I.....	101
	ANEXO II	105
	ANEXO III.....	107

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que um em cada 33 recém-nascidos nasça com malformação congênita no mundo, sendo que, por este motivo, 303.000 vão a óbito anualmente nas primeiras quatro semanas de vida. Nas Américas, as malformações congênitas consistem na segunda principal causa de morte em recém-nascidos e crianças menores de cinco anos (OPAS/OMS, 2017; WHO, 2018). No Brasil, a malformação congênita representa a segunda principal causa de óbito infantil e a principal causa de mortalidade pós-neonatal. A Região Sul do Brasil acompanha a tendência nacional com a malformação congênita representando 26% da mortalidade infantil e 33% da mortalidade pós-neonatal (BRASIL, 2016). Apesar do desfecho das malformações nem sempre ser o óbito, muitas das crianças que sobrevivem têm maior risco de apresentar doenças crônicas e incapacitantes. Assim, além dos próprios indivíduos, as famílias, os sistemas de saúde e a sociedade também podem ser significativamente impactados. Um ou mais fatores genéticos, infecciosos, nutricionais ou ambientais podem estar associados às anomalias congênitas, sendo muitas vezes difícil identificar as causas exatas (WHO, 2018).

É reconhecido que muitas doenças resultam de interações entre fatores genéticos e ambientais (THOMAS, 2010). O DNA recebe dezenas de milhares de lesões por dia, podendo levar ao bloqueio da replicação e da transcrição celular. Quando as lesões não são reparadas ou são reparadas de forma incorreta, podem ocorrer mudanças na sequência de nucleotídeos, ganho, rearranjo ou perda cromossômica, e em última instância, ameaçar a viabilidade celular e do organismo. A instabilidade genômica, tendência aumentada do genoma em adquirir mutações, pode ocorrer como consequência de defeitos herdados, ou induzidos por exposição a agentes ambientais, como produtos químicos, agentes biológicos e radiação (JACKSON e BARTEK, 2009; LANGIE et al., 2015).

A exposição a poluentes, má alimentação e falta de exercício, presentes na vida moderna, podem causar excesso de inflamação, estresse oxidativo e danos ao DNA em última instância. Os eventuais danos ao DNA são reparados de forma eficaz durante a gestação saudável, quando há o equilíbrio entre os antioxidantes e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. No entanto, a gestação apresenta maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, associada à alta demanda metabólica e de oxigênio nos tecidos, podendo esse equilíbrio ser

facilmente rompido (CASANUEVA e VITERI, 2003; FURNESS et al., 2011).

O excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode levar a danos em diferentes componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos desoxirribonucleicos. Dessa forma, a estrutura e função de proteínas celulares podem ser afetadas, alterando a embriogênese. A fisiopatologia de diferentes complicações reprodutivas, como infertilidade, aborto espontâneo, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal e trabalho de parto prematuro foi associada ao estresse oxidativo (DUHIG et al., 2016; PIETRYGA et al., 2017). Com o aumento na concentração de EROs, a capacidade antioxidante natural das células fetais diminui, levando a eventos biomoleculares, como alterações de membrana, disfunção mitocondrial e iniciação anormal de morte celular programada (apoptose), causando defeitos de nascimento (ORNOY et al., 2015). Assim, uma vez estabelecido o estresse oxidativo em períodos críticos do desenvolvimento embrionário, podem ocorrer modificações na expressão gênica, indicando que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da malformação congênita (LOEKEN, 2004; CLAPES et al., 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2015).

Uma vez que o sangue materno e fetal estão intimamente conectados, neste trabalho foi avaliado o envolvimento do estresse oxidativo e da instabilidade genômica em gestantes. O estresse oxidativo foi avaliado através dos ensaios de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada (PC) e catalase (CAT). O ensaio de TBARS detecta as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico resultantes de peroxidação lipídica, o ensaio de PC analisa o dano oxidativo a proteínas por carbonilação e a CAT é uma enzima antioxidante. Já a instabilidade genômica foi investigada através do ensaio cometa e da técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular - citoma (CBMN - citoma). O ensaio cometa avalia quebras de fitas simples e duplas de DNA, além de alterações na estrutura sensíveis ao pH alcalino e *crosslinks*. Este ensaio avalia a genotoxicidade, uma vez que as alterações avaliadas ainda podem ser reparadas. A técnica CBMN - citoma é considerada uma avaliação da mutagenicidade, pois avalia o dano ao DNA já estabelecido após a ação do sistema de reparo. A mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como um marcador inflamatório, e a alfafetoproteína (AFP) e cariótipo fetal foram analisados em conjunto com os dados ultrassonográficos para o diagnóstico da malformação fetal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GESTAÇÃO

2.1.1 Embrião/ Feto

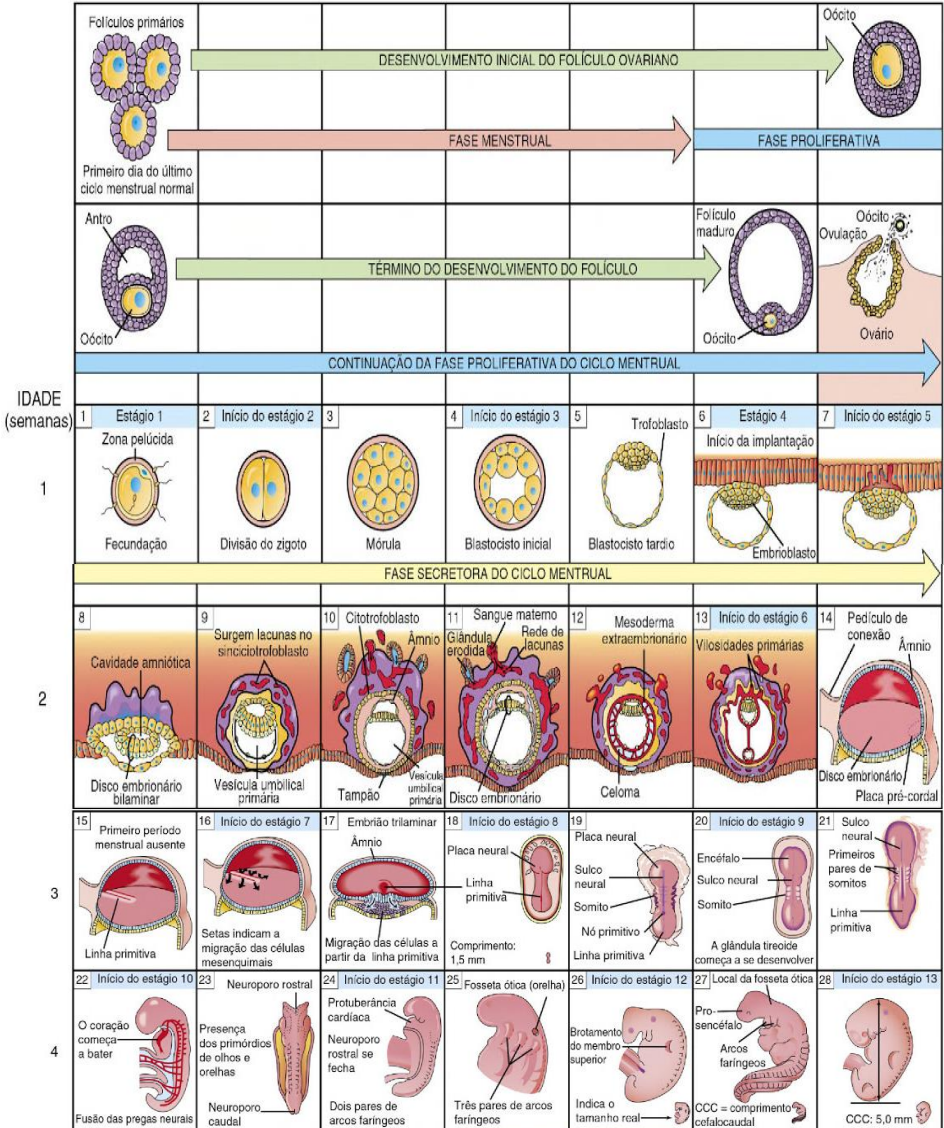
O desenvolvimento humano é iniciado com a fecundação do oócito pelo espermatozoide. O processo contínuo de divisão celular, migração celular, morte celular programada (apoptose), diferenciação, crescimento e rearranjo celular, transforma o zigoto (oócito fecundado) em um ser humano multicelular. Geralmente divide-se o desenvolvimento humano em período pré-natal (antes do parto) e pós-natal (após o parto), sendo o período pré-natal dividido em período embrionário e fetal. A figura 1 ilustra as principais alterações que ocorrem no período pré-natal. No período embrionário, mais especificamente entre a terceira e a oitava semanas, ocorrem os avanços mais visíveis. No período fetal, ocorrem diferenciação e crescimento dos tecidos e órgãos e a taxa de crescimento corporal aumenta. O primeiro trimestre, quando ocorre o desenvolvimento embrionário e fetal inicial, é o período mais crítico do desenvolvimento (MOORE, 2016).

2.1.2 Placenta

A placenta é formada a partir do zigoto e conseqüentemente tem a mesma composição genética fetal. O desenvolvimento placentário ocorre em baixa concentração de oxigênio, mantida por secreções das glândulas endometriais, em vez da circulação materna. O benefício deste ambiente é a proteção do embrião, neste período vulnerável do desenvolvimento, contra os efeitos teratogênicos mediados por radicais livres de oxigênio. Inicialmente as vilosidades que darão origem a placenta se formam sobre toda a superfície do saco coriônico e para evitar a entrada de sangue materno no espaço intervilososo, plugues extravilosos de células citotrofoblásticas se formam e invadem a abertura das artérias espiraladas maternas. Próximo ao fim do primeiro trimestre, as vilosidades periféricas regridem através da ativação de cascatas apoptóticas e a placenta alcança o formato discoide definitivo, atingindo o tamanho máximo em aproximadamente 12 semanas. A circulação materna placentária é estabelecida a partir do deslocamento das células citotrofoblásticas da abertura das artérias espiraladas, com



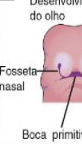
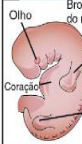


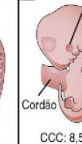

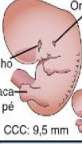



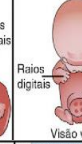
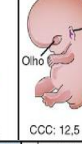


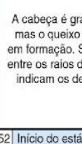
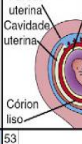
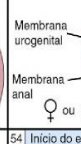
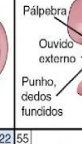

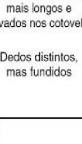


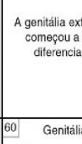
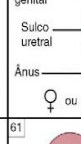
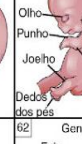
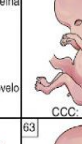


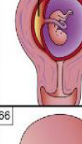
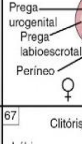
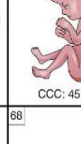
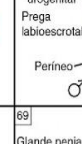
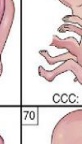
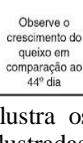

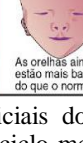

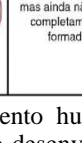

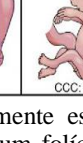
consequente liberação do fluxo sanguíneo materno (BURTON e JAUNIAUX, 2011).

Figura 1- Cronologia do desenvolvimento pré-natal humano da 1ª a 10ª semana.



Continua

Conclusão

5	29  CCC: 5,5 mm	30  Formação do sulco do cristalino, dos cálices ópticos e das fossetas nasais	31  Desenvolvimento do olho Fossela nasal Boca primitiva	32  Início do estágio 14 Olho Conexão Brotamento do membro superior Brotamento do membro inferior	33  Início do estágio 15 Placa da mão	34  Vesículas cerebrais distintas Presença da placa do pé	35  Olho Cordão
6	36  Confluência das cavidades oral e nasal	37  Início do estágio 16 Orelha Olho Placa do pé CCC: 9,5 mm	38  Cabeça grande Formação do lábio superior e do nariz	39  CCC: 10,5 mm	40  Início do estágio 17 Meato acústico externo Olho Raios digitais Placa do pé	41  Raios digitais Visão ventral	42  Orelha Olho CCC: 12,5 mm
7	43  Tamanho real CCC: 13,0 mm	44  Início do estágio 18 Formação das pálpebras	45  A cabeça é grande, mas o queixo está em formação. Sulcos entre os raios digitais indicam os dedos	46  Saco amniótico Parede uterina Cavidade uterina Córion liso	47  Tubérculo genital Membrana urogenital Membrana anal ♀ ou ♂	48  Início do estágio 19 Pálpebra Oviduto externo Punho, dedos fundidos	49  Tamanho real CCC: 18 mm
8	50  Início do estágio 20 Membros superiores mais longos e curvados nos cotovelos Dedos distintos, mas fundidos	51  Orelha Nariz Dedos das mãos Dedos dos pés	52  Início do estágio 21 Testa grande	53  A genitália externa começou a se diferenciar	54  Início do estágio 22 Tubérculo genital Sulco uretral Ânus ♀ ou ♂	55  Orelha O olho Punho Joelho Cotovelo Dedos dos pés	56  Estágio 23 CCC: 30 mm
9	57  Início do período fetal CCC: 45 mm	58  Orelha Ear Cotovelo Joelho Dedos dos pés	59  Placenta	60  Genitália Falo Prega urogenital Prega labioescrotal Perineo ♀	61  Genitália CCC: 50 mm	62  Genitália Falo Prega urogenital Prega labioescrotal Perineo ♂	63  CCC: 50 mm
10	64  A face apresenta um perfil mais humano Observe o crescimento do queixo em comparação ao 44º dia	65  As orelhas ainda estão mais baixas do que o normal	66  Clitóris Lábio menor Sulco urogenital Lábio maior ♀	67  A genitália possui características ♀ ou ♂, mas ainda não está completamente formada	68  Glande peniana Sulco uretral Bolsa escrotal ♂	69  CCC: 61 mm	70  CCC: 61 mm

Ilustra os estágios iniciais do desenvolvimento humano. Inicialmente estão ilustradas as fases do ciclo menstrual com o desenvolvimento de um folículo ovariano contendo um ócito. Aproximadamente 14 dias após o início do último período menstrual ocorre a oocitação (ovulação) e fecundação. A fecundação é seguida pela clivagem do zigoto na tuba uterina, implantação do blastocisto no endométrio (revestimento do útero) e o desenvolvimento inicial do embrião.

Fonte: Moore (2016).

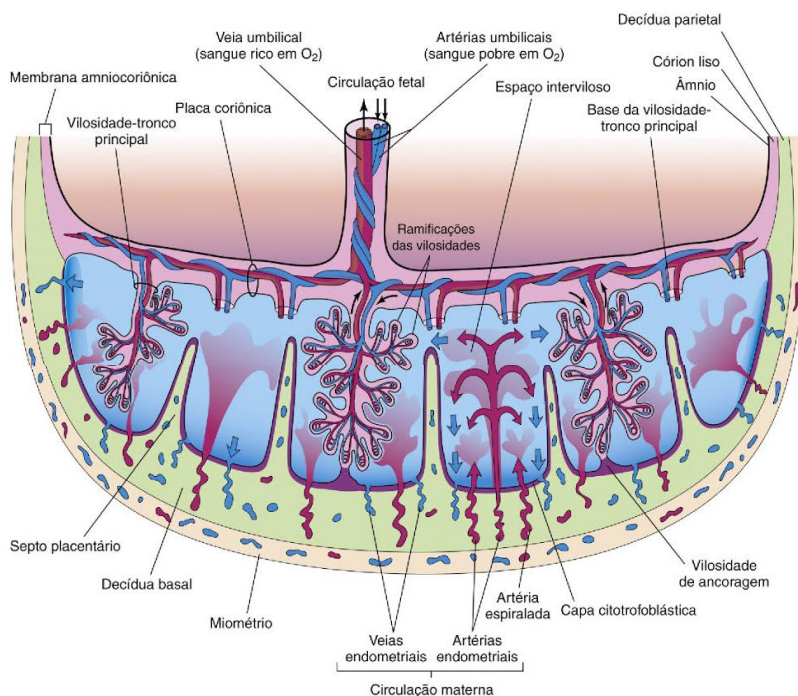
O início da circulação materna representa um desafio oxidativo à placenta. Antes do estabelecimento da circulação materna placentária, são utilizadas vias metabólicas que envolvem açúcares não fosforilados que não requerem altas concentrações de oxigênio para o ótimo funcionamento. A partir do estabelecimento da circulação materna na placenta, entre 10 e 12 semanas, ocorre um aumento de cerca de três vezes na concentração de oxigênio. Com isso, há uma explosão de estresse oxidativo na placenta, explicada pela necessidade de adaptação do tecido ao novo ambiente rico em oxigênio (DENNERY, 2010; BURTON e JAUNIAUX, 2011).

A placenta madura é formada por uma superfície que está em contato com o feto e fixa o cordão umbilical (córion viloso), e outra que está em contato com o endométrio materno (decídua basal). A cavidade formada entre estas superfícies é chamada de espaço interviloso. O sangue fetal, pobre em oxigênio, chega à placenta através das artérias umbilicais, que se dividem em artérias coriônicas no local de inserção do cordão umbilical. As artérias coriônicas se ramificam na placa coriônica e entram nas vilosidades coriônicas formando o sistema arteriocapilar-venoso (figura 2). Acredita-se que estas estruturas sejam os principais locais de troca materno-fetal. Uma vez bem oxigenado, o sangue nos capilares fetais, passa para as veias que convergem formando a veia umbilical. A veia umbilical faz o retorno do sangue oxigenado para o feto. Já o sangue materno é impulsionado para o espaço interviloso através das artérias espiraladas na decídua basal. Como o fluxo sanguíneo das artérias espiraladas é pulsátil, a pressão com que o sangue entra é consideravelmente mais alta do que a do espaço interviloso, sendo impulsionado em direção à placa coriônica. À medida que a pressão diminui, o sangue flui lentamente pelas ramificações das vilosidades permitindo as trocas metabólicas e gasosas com o sangue fetal. O retorno para o sangue materno é feito através das veias endometriais (BURTON e FOWDEN, 2015; MOORE, 2016).

A placenta faz a conexão do feto com o meio externo. É um órgão fetomaterno onde ocorrem as trocas gasosas, suprimento de nutrientes e retirada dos produtos de degradação. A placenta, juntamente com o cordão umbilical, faz o transporte dessas substâncias que é realizado nos dois sentidos, tanto no sentido feto-materno (dióxido de carbono e excretas), quanto no sentido materno-fetal (nutrientes e oxigênio). Essa transferência placentária pode ser feita por diferentes processos (difusão simples, difusão facilitada, transporte ativo e pinocitose) de acordo com o tamanho, configuração e carga da molécula. A membrana placentária, até a vigésima semana, é formada

por quatro camadas: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tecido conjuntivo das vilosidades e endotélio dos capilares fetais (figura 3). À medida que a gestação avança as células do citotrofoblasto deixam de estar presentes em grandes áreas das vilosidades, diminuindo a espessura da membrana placentária e aproximando os sangues materno e fetal. Usualmente não há mistura entre o sangue materno e o fetal, no entanto, quando ocorrem mínimos defeitos na membrana placentária, pequenas quantidades de sangue fetal podem passar para a circulação materna (MOORE, 2016).

Figura 2- Desenho esquemático de corte transversal de placenta madura.

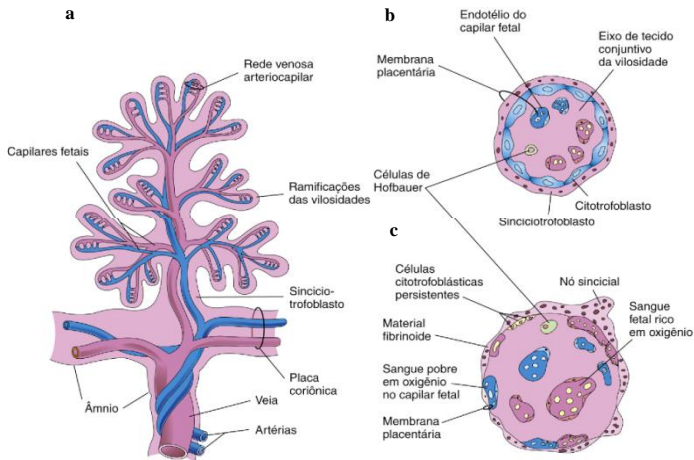


A ilustração demonstra a parte fetal da placenta (córion viloso) com os troncos vilosos que fazem parte da circulação fetal, e a parte materna da placenta (decídua basal) que contém as veias e artérias endometriais. O sangue materno é impulsionado para o espaço intervilloso através das artérias espiraladas na decídua basal. As artérias umbilicais levam o sangue pouco oxigenado (ilustrado em azul) até a placenta e a veia umbilical leva o sangue rico em oxigênio (ilustrado em vermelho) para o feto.

Fonte: Moore (2016).

Poucas substâncias não são capazes de atravessar a membrana placentária, assim, a maioria das substâncias presentes no sangue materno pode alcançar o sangue fetal (MOORE, 2016). No entanto, o sinciotrofoblasto contém uma variedade de enzimas e transportadores que garantem a desintoxicação e efluxo de xenobióticos, desempenhando um papel equivalente às células hepáticas no adulto. Estas competências do sinciotrofoblasto são de extrema importância para o feto, pois independentemente do sexo, hormônios do estresse materno e poluentes ambientais, garantem o desenvolvimento fetal sem comprometer o sistema neuroendócrino e gonadal. A enzima 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase 2 (11- β HSD2), por exemplo, oxida o cortisol materno para o metabólito inativo cortisona. Assim, os efeitos potencialmente prejudiciais dos hormônios do estresse materno são limitados pela placenta (BURTON e FOWDEN, 2015).

Figura 3- Membrana placentária.



a: ilustração de uma vilosidade coriônica tronco; **b:** corte transversal de uma ramificação das vilosidades com 10 semanas de gestação; **c:** corte transversal de uma ramificação das vilosidades a termo.

Fonte: Moore (2016).

A principal classe de transportadores ativos primários na placenta é a família de transportadores transmembranares de cassete de ligação de ATP (ABC), também chamados de proteínas de resistência associada à multidrogas (MRP). Esses transportadores são capazes de conferir

proteção à exposição à xenobióticos potencialmente nocivos e estão localizados na superfície apical do sinciciotrofoblasto e no endotélio dos capilares das vilosidades a termo. Além do efluxo de uma ampla gama de compostos orgânicos aniônicos, fazem o transporte de uma série de substratos endógenos, como lipídios, esteróis e nucleotídeos. Os transportadores ABC também conferem proteção celular aos efeitos nocivos do estresse oxidativo. Um exemplo é o ABCC1/ MRP1, que além de ser um importante transportador de glutathione reduzida e oxidada, faz o transporte de ânions orgânicos conjugados a glutathione, glicuronídeo e sulfato (AYE e KEELAN, 2013; BURTON e FOWDEN, 2015).

2.1.3 Alterações fisiológicas na gestante

Durante a gestação o organismo feminino é submetido a profundas modificações e adaptações para conseguir suportar o aumento das exigências físicas e metabólicas deste período. Diversos sistemas sofrem adaptações fisiológicas importantes, como o sistema cardiovascular, respiratório, hematológico, renal, gastrointestinal e endócrino (TAN e TAN, 2013).

Na gestação, ocorre um aumento do volume sanguíneo que leva a um aumento do retorno sanguíneo ao coração. Simultaneamente, há uma diminuição no retorno venoso devido à vasodilatação, resultando no aumento, em torno de 20-30%, da frequência cardíaca. Ocorre um aumento no fluxo sanguíneo para pele, rins e seios, e o fluxo sanguíneo para o útero e a placenta constitui até 25% do débito cardíaco. Sendo assim, o aumento do débito cardíaco na gestação é importante para a gestante acompanhar o aumento do consumo basal de oxigênio e para o desenvolvimento fetal (TAN e TAN, 2013).

O consumo de oxigênio aumenta em torno 30% e a taxa metabólica aumenta em torno de 15% na gestação. A progesterona leva a hiperventilação, sendo a dispneia observada em 60 a 70% das gestantes normais com 30 semanas de gestação. As alterações da fisiologia respiratória da gestante resultam em maior pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO_2) que facilita a transferência de oxigênio da circulação materna para fetal, e menor pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (PaCO_2) facilitando a transferência de dióxido de carbono na direção inversa. Com a diminuição da PaCO_2 na circulação materna, ocorre um estado de alcalose respiratória que é compensado pelo aumento na excreção de bicarbonato, garantindo a manutenção do pH materno na faixa de 7,40 a

7,45. As concentrações mais baixas de bicarbonato também alteram a curva de dissociação do oxigênio, facilitando a transferência para a circulação fetal, através da diminuição da afinidade da hemoglobina materna pelo oxigênio (TAN e TAN, 2013).

Durante a gestação, o volume sanguíneo materno aumenta em torno de 10 a 15% com 7 semanas, atingindo o pico em torno de 30 a 34 semanas. O aumento do volume plasmático de 30 a 50% é acompanhado pelo aumento desproporcional, de 18 a 25%, na produção de glóbulos vermelhos, resultando em anemia dilucional. O aumento do volume plasmático e a queda na viscosidade sanguínea são importantes para aumentar o fluxo sanguíneo em órgãos como o útero e os rins, além de ser um mecanismo adaptativo à perda de sangue durante o parto. Os estoques de ferro materno são transferidos para feto, com queda da hemoglobina à medida que a gestação avança, mais notável entre 30 e 34 semanas de gestação, com o hematócrito (32-34%) na gestante sempre menor em comparação à mulher não gestante. Além das alterações na série vermelha, ocorre também um aumento na contagem de leucócitos, mediada por adrenocorticoide, com variação na proporção relativa das subclasses de linfócitos T no decorrer da gestação (SCHÖBER et al., 2012; TAN e TAN, 2013; SOMA-PILLAY et al., 2016).

O útero aumentado desloca os rins em direção cefálica. A combinação dos efeitos da progesterona e da compressão dos ureteres na cavidade pélvica, a partir do primeiro trimestre, resulta em uma dilatação do sistema de coleta renal. Estas mudanças levam à estase urinária que aumenta a incidência de infecções do trato urinário, nefrolitíase e pielonefrite na gestação. Ao mesmo tempo, há uma perda da firmeza muscular da bexiga, aumentando a frequência urinária. Estes sintomas estão mais presentes no terceiro trimestre à medida que a cabeça fetal se encaixa na pélvis. Ocorre uma dilatação vascular renal em decorrência da vasodilatação sistêmica, com consequente aumento na taxa de filtração glomerular (TFG), de 40 a 50% no final do primeiro trimestre, mantida até 36 semanas de gestação. O aumento da TFG, juntamente com mudanças na seletividade de carga da membrana glomerular, leva ao aumento da excreção urinária de proteína e albumina. O aumento nos níveis de estradiol ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando a um aumento da reabsorção de sódio e da retenção de água nos rins. Isto gera o estado hipervolêmico e hiposmolar característico da gestação que ajuda a sustentar o aumento do volume plasmático na vasculatura sistêmica dilatada (TAN e TAN, 2013; SOMA-PILLAY et al., 2016).

Com o avanço do crescimento uterino no decorrer da gestação, os órgãos digestivos, são deslocados. Em conjunto com o deslocamento mecânico do intestino e estômago, concentrações elevadas de progesterona contribuem para esvaziamento gástrico tardio e para a redução da contratilidade do esfíncter esofágico. Ocorre também o aumento da produção placentária de gastrina, levando ao aumento da acidez gástrica. Estas alterações conferem, em até 50% das mulheres grávidas, a sensação de inchaço e constipação, náuseas e vômitos; além da incidência de esofagite por refluxo e sintomas de azia, em 50 a 80% das parturientes (TAN e TAN, 2013).

No primeiro trimestre, a hiperêmese gravídica pode estar associada à elevação da concentração de tiroxina livre (T4L) e supressão da tireotrofina (TSH), configurando um hipertireoidismo bioquímico. A elevação da gonadotrofina coriônica humana (HCG) no primeiro trimestre, resulta na diminuição transitória da liberação do TSH pela hipófise anterior, em decorrência da atividade tireotrópica do HCG. Isto ocorre devido à semelhança estrutural entre os dois hormônios. As concentrações circulantes de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) total aumentam pelo estímulo do estrogênio à síntese hepática de globulina de ligação à tiroxina. No entanto, as concentrações de T4 e T3 livres permanecem inalteradas no decorrer da gestação (TAN e TAN, 2013).

O embrião secreta ativamente HCG durante o processo de implantação, podendo ser detectada no soro materno a partir do 8º dia após a fecundação. O HCG tem a função de prolongar a atividade hormonal do corpo lúteo, para a manutenção da produção de progesterona, mantendo assim o endométrio gestacional. Durante a progressão da implantação, o embrião inicia a produção de esteróides. A manutenção bem sucedida da gestação depende da tolerância materna ao feto. Para manter e proteger a gravidez da rejeição imunológica, ocorre a biosíntese materna de esteróides e proteínas pela decídua. O HCG e a progesterona secretados pelo embrião, juntamente com o cortisol produzido pela decídua, agem em combinação para suprimir a resposta imune materna (FELDT-RASMUSSEN e MATHIESEN, 2011; OLUWATAYO et al., 2016).

A placenta é um importante órgão endócrino e os hormônios secretados por ela influenciam diretamente o comportamento e a fisiologia da gestante. Enquanto que no início da gestação há um estímulo para a ingestão de alimentos e armazenamento de energia, ao final, as reservas armazenadas são requeridas para dar suporte ao crescimento fetal e a lactação. Os hormônios lactogênio placentários

(hPL), hormônio de crescimento placentário (hGH), estrogênio e progesterona tem um importante papel nesta regulação. Após a sexta semana de gestação há um aumento na produção de estrogênio, progesterona e hPL pela placenta. Tanto o hPL quanto a progesterona são estimulantes do apetite, levando a um aumento na ingestão de alimentos pela gestante durante o primeiro trimestre, quando as demandas metabólicas do embrião ainda são relativamente baixas. O resultando é a deposição de gordura e a perda dos mecanismos homeostáticos normais que regulam o equilíbrio energético. Há uma diminuição do catabolismo do tecido adiposo em decorrência do aumento dos níveis de triglicerídeos pelo aumento da síntese hepática e diminuição da atividade da lipoproteína lipase. Existe um aumento nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos. O aumento de triglicerídeos satisfaz as necessidades energéticas da mãe, poupando a glicose para o feto. As concentrações do colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) também aumentam, chegando a 50% a termo. Este aumento é importante para a esteroidogênese placentária. O estrogênio, além de estimular o aumento da absorção do LDL colesterol para a produção de esteróides placentários, aumenta o fluxo sanguíneo uteroplacentário e prepara os seios para a lactação, através do aumento da síntese e secreção de prolactina (NEWBERN e FREEMARK, 2011; BURTON e FOWDEN, 2015; SOMA-PILLAY et al., 2016).

Durante a gestação o hormônio de crescimento (GH), normalmente secretado pela pituitária, é substituído pelo hormônio de crescimento placentário (hGH), de modo que o GH não é detectado na circulação materna após 24 semanas de gestação. Em contraste, o hGH aumenta rapidamente após a metade da gestação, atingindo a máxima concentração entre 34 e 37 semanas. Não são detectadas concentrações deste hormônio na circulação fetal, sugerindo que as ações do hGH estão restritas aos tecidos maternos e uteroplacentários. A presença aumentada do hGH na metade da gestação parece ser o principal fator de resistência a insulina materna, além do aumento do cortisol livre, TNF- α e progesterona que diminuem a ação da insulina no tecido adiposo e músculo esquelético, diminuindo a sensibilidade a insulina materna. A secreção do hGH é regulada pelo tamanho placentário e pela glicemia materna, com o jejum e a hipoglicemia estimulando a produção deste hormônio. A glicose é o principal substrato para o metabolismo placentário e fetal, e atravessa a placenta por difusão facilitada, sendo o fluxo para o feto, criticamente dependente do gradiente de concentração. O hGH tem função antagonista à insulina e prejudica a utilização da glicose pela gestante. Essa privação de glicose, gera um *loop* de

feedback com contínua estimulação de liberação de hGH, garantindo o fornecimento constante de nutrientes para o feto (NEWBERN e FREEMARK, 2011; BURTON e FOWDEN, 2015).

2.2 MALFORMAÇÕES

As malformações congênitas, também chamadas de defeitos congênitos, distúrbios congênitos ou anomalias congênitas, podem ser definidas como anomalias estruturais ou funcionais que ocorrem durante a vida intrauterina, identificadas antes ou após o nascimento. Um ou mais fatores genéticos, infecciosos, nutricionais ou ambientais podem estar associados às anomalias congênitas, sendo muitas vezes difícil identificar as causas exatas. Com isso, aproximadamente 50% de todas as anomalias congênitas não tem a causa conhecida (WHO, 2018).

O diabetes mellitus pré-gestacional aumenta em 3 a 5 vezes a chance de malformação congênita. No entanto, as gestantes que desenvolveram diabetes mellitus durante a gestação não apresentam o mesmo risco aumentado, uma vez que geralmente esta condição se instala após a 20^a semana de gestação, quando a embriogênese já está completa (WU et al., 2012; CLAPES et al., 2013). A embriopatia diabética faz parte dos 50% dos casos em que se conhece a causa da malformação. Com isso, estudos em modelos animais foram realizados para melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos. Um dos objetivos é elaborar estratégias para reduzir as malformações por embriopatia diabética ou por outras causas que envolvam mecanismos similares. Uma das dificuldades encontradas na tentativa de reduzir esses casos é que os defeitos congênitos ocorrem durante o estágio embrionário (primeiras oito semanas após a fecundação – figura 1), período em que a maioria das mulheres ainda desconhece a gravidez. Diversos órgãos fetais podem ser afetados por esta condição materna, no entanto, malformações do SNC e cardiovascular são as mais frequentes, ocorrendo em consequência de um déficit na migração e sobrevivência das células da crista neural envolvidas na formação destes sistemas (LOEKEN, 2004; CLAPES et al., 2013).

A susceptibilidade genética à doença é representada por fatores genéticos determinantes e fatores genéticos de susceptibilidade. Os fatores determinantes indicam se o indivíduo irá ou não desenvolver determinada doença, e os fatores de susceptibilidade não são determinantes, mas podem aumentar a susceptibilidade à determinada doença. Diferentes fatores genéticos, como deleções, duplicações ou mutações de genes, foram associados aos defeitos congênitos cardíacos

e do tubo neural em embriões de mães diabéticas. Por exemplo, a variação genética no locus HIF-1 α em camundongo pode influenciar o risco de malformação, com a exposição ao ambiente intrauterino de mãe diabética aumentando as chances de defeitos cardíacos nos embriões heterozigotos nulos para HIF-1 α . Sugere-se a herança multifatorial, com o envolvimento de diferentes genes de susceptibilidade e diferentes mutações sobrepostas em ambientes desfavoráveis (ORNOY et al., 2015).

Nos últimos 50 anos, houve um aumento nas opções de triagem pré-natal de defeitos congênitos e aneuploidias cromossômicas, sendo a ultrassonografia parte importante desta evolução. O uso de imagens de ultrassom durante o pré-natal pode auxiliar na avaliação do risco para certas aneuploidias cromossômicas e síndromes genéticas, com os defeitos graves, na maioria dos casos, sendo detectados antes dos menores. A gravidade das malformações detectadas traz grande impacto no diagnóstico pré-natal das malformações, com especial relevância nos países onde apenas após o conhecimento da viabilidade fetal, a interrupção da gravidez é autorizada por lei (RAO e PLATT, 2016; TODROS et al., 2001).

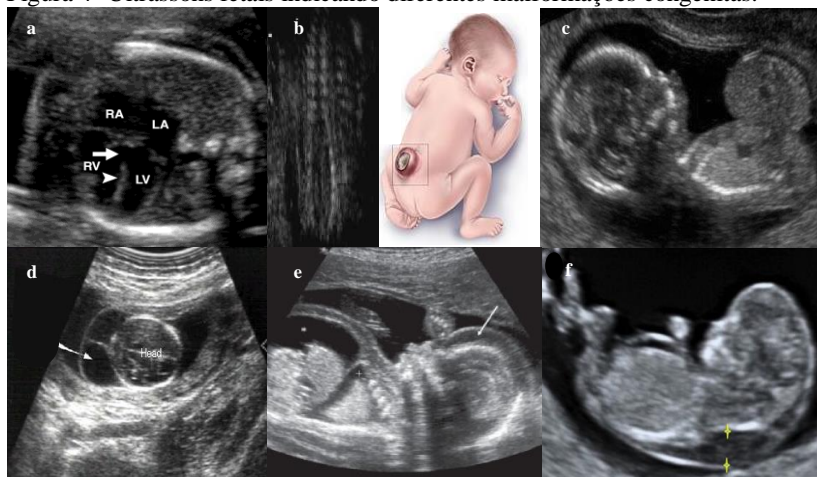
As anomalias cromossômicas mais comumente encontradas são Trissomias 21, 18, 13 e Síndrome de Turner (45,X). Além disso, anomalias cardíacas, neurológicas, gastrointestinais e genitourinárias também podem ser detectadas por ultrassonografia, o que pode ser uma fonte de morbidade perinatal considerável (RAO e PLATT, 2016). A seguir, serão abordados os tipos de malformações fetais e as síndromes genéticas mais frequentes.

2.2.1 Tipos de malformações

A malformação cardíaca congênita (figura 4a) é a principal causa de morbidade e mortalidade entre os recém-nascidos, presente em 2 a 6,5 casos a cada 1000 nascidos vivos. A maior parte das cardiopatias congênitas estruturais descritas na vida pós-natal é detectada entre 18 e 22 semanas de vida intrauterina, através da ultrassonografia cardíaca fetal. Acredita-se que os defeitos cardíacos congênitos sejam causados por anormalidades ambientais, genéticas e cromossômicas, por exemplo, a exposição materna a teratogêno, distúrbio metabólico materno, defeito cardíaco congênito em familiares, deficiência de ácido fólico e autoanticorpos. Há uma forte associação entre a presença de doença cardíaca fetal, anormalidades extracardíacas e aneuploidias. As anormalidades extracardíacas estão associadas em 25% dos casos. Em

torno de 17 a 48% dos fetos com cardiopatia congênita estrutural apresentam anormalidades cromossômicas. Porém, apenas 5 a 10% dos lactentes com doença cardíaca congênita são cromossomicamente anormais, provavelmente devido à tendência de perda espontânea fetal (TODROS et al., 2001; RAJIAH et al., 2011).

Figura 4- Ultrassons fetais indicando diferentes malformações congênitas.



a: malformação cardíaca – defeito do septo ventricular – visão das quatro câmaras cardíacas mostra pequeno defeito (seta) na porção de entrada do septo interventricular (ponta de seta); **b:** defeito do tubo neural – espinha bífida; **c:** defeito da parede abdominal - onfalocele; **d:** higroma cístico (seta) (head: cabeça); **e:** hidropsia fetal – edema subcutâneo (seta), ascite (*) e efusão pleural (+); **f:** translucência nucal - os asteriscos delimitam a translucidez nucal anormal (NT: 4,39 mm); RA: átrio direito; RV: ventrículo direito; LA: átrio esquerdo; LV: ventrículo esquerdo.

Fonte: Rajiah e colaboradores (2011); Gonçalves e colaboradores (2017); Neural... (2017); Leinart e Jeanty (2017); Ob-Gyn (2018); Castagno e colaboradores (2007); Rao e Platt (2016).

Os defeitos no tubo neural também ocorrem em muitas síndromes e distúrbios cromossômicos. A falha de fechamento do tubo neural pode levar a anencefalia (ausência total ou parcial do encéfalo), encefalocele (herniação de tecido e/ou meninges cerebrais através de uma fissura no crânio) ou espinha bífida (defeito no fechamento vertebral ao longo da linha média) (figura 4b). A incidência destes tipos de defeitos reduz com a utilização de suplementos vitamínicos contendo ácido fólico durante o período periconcepcional. A anencefalia pode ser detectada por

ultrassom a partir de 12 semanas de gestação e espinha bífida de 16 a 20 semanas. Os anencefálicos nascidos vivos geralmente morrem em horas ou dias (VERITY et al., 2003; JOÓ et al., 2007).

Os defeitos mais comuns da parede abdominal são a onfalocele e a gastrosquise (figura 4c). Na onfalocele, ocorre a extrusão das vísceras abdominais, devido a um defeito da parede abdominal média. Nesse caso, as vísceras abdominais são cobertas por um saco membranoso na base do cordão umbilical. Na gastrosquise, ocorre a herniação do intestino e por vezes também do trato urogenital, sem membrana circundante na cavidade amniótica, devido a um defeito na parede abdominal anterior, tipicamente localizado à direita do anel umbilical (STOLL et al., 2008).

Os higromas císticos são malformações congênicas do sistema linfático, apresentando-se normalmente como uma massa indolor. O diagnóstico pré-natal do higroma cístico com ultrassom está bem documentado na literatura (figura 4d). Em cerca de 80% dos casos, a localização dos higromas císticos é a região cérvico-facial, podendo ser encontrado na axila, mediastino, retroperitoneo, vísceras abdominais, virilha, ossos e escroto. Em cerca de 62% dos casos, o feto com higroma cístico pode estar associado a outras anomalias, como a síndrome de Turner, síndrome de Down, trissomia 18 e trissomia 13 (MIRZA et al., 2010).

A hidropisia fetal pode ser definida como um acúmulo anormal de líquido em duas ou mais áreas do corpo fetal, como ascite, derrame pleural, derrame pericárdico e edema da pele, sendo facilmente reconhecida por ultrassom (figura 4e). A hidropisia pode resultar de um grande número de causas, incluindo anomalia cardíaca e não cardíaca, síndromes, aneuploidia, infecção congênita e outras condições (YEOM et al., 2015).

A translucência nucal (figura 4f) é caracterizada por um acúmulo subcutâneo de líquido atrás do pescoço do feto, visível por ultrassom até 15 semanas de gestação e medida através do comprimento do tecido nucal fetal, vista lateral. Este espaço está presente em todos os fetos e faz parte do desenvolvimento normal. No entanto, o alargamento da medida da translucência nucal está associado a anomalias estruturais e síndromes genéticas, levando a um maior risco de aborto e morte fetal intrauterina. Na maioria dos casos, é recomendada a realização de amniocentese para uma melhor ideia do diagnóstico. Nos casos em que o cariótipo apresenta-se normal e não são encontradas outras alterações fetais, a chance de um desfecho normal é alta e não é diferente da população geral (BAKKER et al., 2014; HIXSON et al., 2015).

2.2.2 Síndromes genéticas

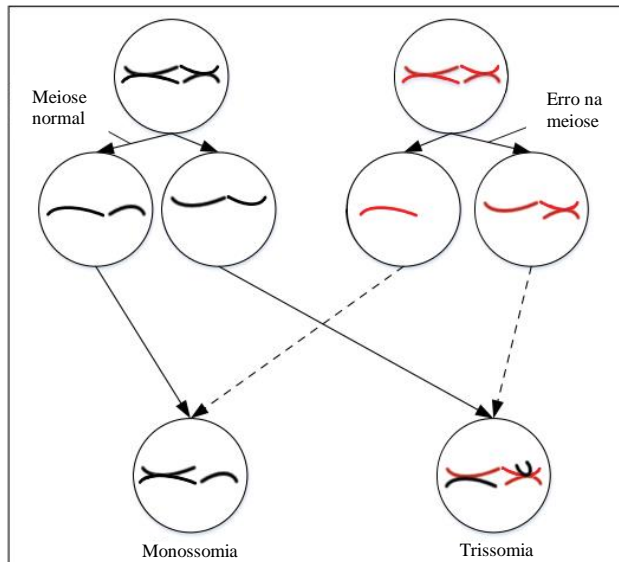
Os seres humanos são diploides, com 23 pares de cromossomos, totalizando 46 cromossomos por célula. Os gametas (espermatozóides e oócitos), formados durante a meiose, são haploides, cada um contendo 23 cromossomos isolados por célula. A combinação de gametas haploides maternos e paternos, após a fecundação, resulta novamente em uma célula diploide com 23 pares de cromossomos, ou 46 cromossomos no total. Erros no processo de segregação meiótica, como mostrado na figura 5, levam a aberrações cromossômicas (HIXSON et al., 2015).

A presença de um cromossomo 21 extra, conhecida como síndrome de Down (SD), ocorre em cerca de 1 em cada 800 recém-nascidos. É uma condição cromossômica que está associada à deficiência intelectual, aparência facial característica e tônus muscular fraco (hipotonia) na infância. Pessoas com SD podem ter uma variedade de defeitos congênitos, sendo que cerca de metade nasce com algum defeito cardíaco. Anormalidades digestivas, como um bloqueio do intestino, também podem ocorrer, mas são menos comuns. A maioria dos casos de SD não são herdados. A anormalidade cromossômica ocorre como um evento aleatório durante a formação de células reprodutivas em um dos pais. Em 95% dos casos ocorre um erro na meiose I ou II, normalmente de origem materna. Uma célula reprodutora com um número anormal de cromossomos é o resultado de um erro de segregação na divisão celular, como descrito anteriormente, chamado não-disjunção. Por exemplo, se um oócito ou espermatozóide receber uma cópia extra do cromossomo 21 e uma dessas células reprodutivas atípicas contribuir para a constituição genética de uma criança, a criança terá um cromossomo 21 extra (FINTELMAN-RODRIGUES et al., 2009; NIH, 2018a).

A síndrome da trissomia do cromossomo 18 ou síndrome de Edwards é a segunda síndrome de trissomia dos autossomos mais comum. A prevalência é estimada em 1 para 6000 a 8000 nascidos vivos, mas a prevalência global é maior, aproximadamente 1 para 2600. Essa diferença ocorre devido à alta frequência de perda fetal e interrupção da gravidez após o diagnóstico pré-natal. Atualmente, a maioria dos casos de trissomia 18 é diagnosticada no pré-natal. Diferentes anomalias observadas na ecografia podem estar associadas a esta síndrome, como aumento na espessura da translucência nucal, retardamento do crescimento, cisto de plexo coroide (acúmulo de líquido na região do plexo coroide cerebral, área responsável pela

produção de líquido cefalorraquidiano), sobreposição de dedos e malformações cardíacas congênitas. A probabilidade de sobrevivência após o nascimento com esta aneuploidia é extremamente baixa, com apenas cerca de 5 a 10% das crianças vivendo além do primeiro ano de vida (CEREDA e CAREY, 2012).

Figura 5- Aberrações cromossômicas em decorrência de erros de segregação na meiose.



Erros no processo de segregação meiótica levam a aberrações cromossômicas, exemplificadas na figura como monossomia e trissomia.

Fonte: adaptado de Hixson e colaboradores (2015).

A trissomia do 13 ou síndrome de Patau, ocorre em aproximadamente 1 para 16000 nascidos vivos anualmente no mundo. Está associada com deficiência mental grave e anormalidades físicas em muitas partes do corpo, sendo que muitas crianças morrem em dias ou poucas semanas de vida e apenas 5 a 10% vivem além do primeiro ano com esta condição. Diferentes tipos de anomalias podem ser observadas nestes indivíduos, como defeitos cardíacos, anormalidades do cérebro ou medula espinhal, olhos pequenos ou pouco desenvolvidos (microftalmia), dedos extras dos pés ou das mãos, abertura labial (lábio leporino) com ou sem abertura do céu da boca (fenda palatina) e tônus muscular fraco (hipotonia) (NIH, 2018b).

A síndrome de Turner (ST) é uma grave anomalia dos cromossomos sexuais, em que, na maioria dos casos, o paciente do sexo feminino apresenta cariótipo 45,X. Em alguns casos, apenas uma parte do cromossomo X está faltando. Assim como na SD, a maioria dos casos de ST não são herdados. Nos casos de monossomia do X, ocorre uma não disjunção na divisão meiótica, com perda de um cromossomo X em determinada célula (espermatozoide ou ócito), que ao fazer parte da formação do zigoto, gera um embrião com ST. Aborto espontâneo de fetos com ST é muito comum, sendo que apenas 1% destas gestações resulta em nascido vivo. ST é uma condição cromossômica que afeta o desenvolvimento em mulheres, sendo que de um terço, a metade destes indivíduos nasce com algum defeito cardíaco (NIH, 2018c; HIXSON et al., 2015).

2.3 LÍQUIDO AMNIÓTICO

O líquido amniótico (LA) é um meio complexo e dinâmico que muda à medida que a gestação progride. Desempenha um importante papel protetor ao fornecer amortecimento mecânico, como uma almofada protetora, e permitir o movimento fetal, além de conter nutrientes e fatores de crescimento que auxiliam o crescimento fetal (UNDERWOOD et al., 2005).

A água do LA vem originalmente do plasma materno e passa através das membranas fetais com base nas forças hidrostáticas e osmóticas. Com o desenvolvimento da placenta e dos vasos fetais, a água e o soluto do plasma materno passam através da placenta para o feto e depois para o LA. Ocorre um aumento no volume de líquido amniótico, aproximadamente, de 25 mL em 10 semanas, para 400 mL em 20 semanas, atingindo 800 mL em 28 semanas de gestação. Na oitava semana de gestação os rins fetais produzem urina e pouco depois começa a deglutição fetal. Porém até a segunda metade da gravidez nem a urina fetal nem a deglutição contribuem significativamente para o conteúdo ou volume de LA. A queratinização da pele fetal começa entre a décima nona e vigésima semana de gestação e geralmente está completa na vigésima quinta semana, quando a relação entre o tamanho fetal e o volume de LA não é mais linear (UNDERWOOD et al., 2005).

Depois que a pele fetal é totalmente queratinizada, o volume de LA é determinado por fatores que compreendem a circulação do LA, sendo identificadas vias de troca entre o espaço amniótico e os tecidos circundantes. A produção de LA é predominantemente realizada por excreção de urina fetal e a secreção de fluidos orais, nasais, traqueais e

pulmonares; e a remoção por deglutição fetal (UNDERWOOD et al., 2005).

Polidrâmnio é o termo usado para descrever um excesso de líquido amniótico (1500 a 2000 mL), enquanto oligodrâmnio refere-se à diminuição da quantidade (menos que 400 mL). Ambas as condições estão associadas a um aumento na incidência de defeitos de nascimento (SHIPP et al., 1996; DASHE et al., 2002).

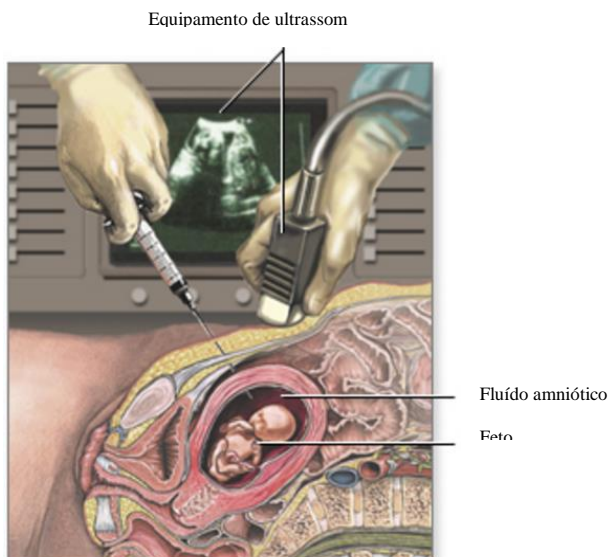
A coleta do líquido amniótico ou amniocentese (figura 6) é geralmente realizada entre 16 e 28 semanas de gestação. Sob a orientação de imagens de ultrassom, uma agulha é usada para aspirar aproximadamente 20 mL de líquido amniótico. Como o líquido amniótico está diretamente em contato com o feto (orofaringe, pulmão, trato gastrointestinal, pele e sistema urinário), o cariótipo realizado a partir deste tipo de amostra é considerado "padrão-ouro" nos testes de aneuploidia fetal devido à alta sensibilidade e risco relativamente baixo (SLONIM et al., 2009; HIXSON et al., 2015). A pesquisa de anormalidades cromossômicas no líquido amniótico confere informações clínicas preciosas, permitindo que os médicos e pais estejam preparados para oferecer os cuidados necessários ao bebê (HATTORI et al., 2015).

O cariótipo refere-se ao conjunto completo de cromossomos em um organismo (figura 7). As células fetais flutuantes no líquido amniótico são colocadas em cultura de longa duração. Após 10 a 15 dias de cultura é acrescentada a colchicina, para impedir a formação do fuso acromático, estagnando as divisões celulares na metáfase. A metáfase é a etapa em que os cromossomos estão mais individualizados e condensados, mais apropriada para a análise do cariótipo. Em seguida, é feito o processo de colheita e a substituição do meio por uma solução hiposmótica, com subsequente fixação das células. Algumas gotas desta suspensão são colocadas em lâminas de microscopia, que são tratadas com a enzima tripsina e coradas com Giemsa para permitir o bandeamento (técnica da banda GTG) e a identificação dos cromossomos. Os cromossomos são identificados e agrupados aos pares de acordo com características como tamanho e bandeamento, permitindo avaliação de anormalidades tanto numéricas quanto estruturais (HIXSON et al., 2015; GUS, 2011).

Outro exame realizado a partir da amostra de líquido amniótico é a dosagem de alfafetoproteína (AFP). A alfafetoproteína (AFP) é uma glicoproteína plasmática sintetizada primeiramente pela vesícula umbilical embrionária, depois pelo trato gastrointestinal e, finalmente, pelo fígado fetal. No feto, a concentração de AFP atinge o pico sérico ao

final do primeiro trimestre, declinando exponencialmente entre 14 e 32 semanas de gestação, devido à expansão do volume sanguíneo e a diminuição da síntese desta proteína. A AFP é excretada para o líquido amniótico através da urina fetal. Desta forma, o padrão de concentração da AFP no LA, de acordo com a idade gestacional, é semelhante à concentração de AFP no soro fetal. A AFP atinge a circulação materna por uma combinação de difusão transplacentária e transamniótica. Diferentemente do padrão de AFP encontrado no LA e no soro fetal, a concentração de AFP no soro materno atinge o pico entre 28 e 32 semanas de gestação (WYSZYNSKI, 2005).

Figura 6- Coleta de líquido amniótico.



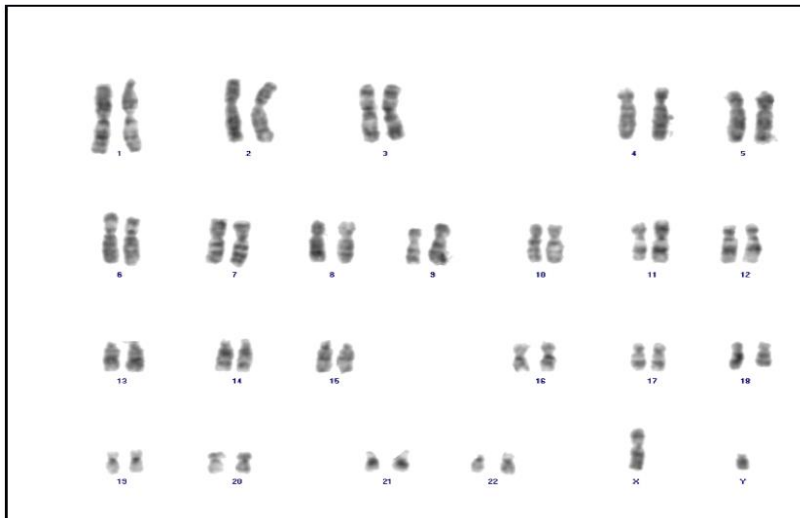
Uma agulha, guiada com o auxílio de imagens de ultrassom, é utilizada para aspirar aproximadamente 20 mL de líquido amniótico. A amostra coletada pode ser utilizada para a realização de diferentes exames, como o cariótipo fetal e a dosagem de alfafetoproteína.

Fonte: adaptado de Sacks e colaboradores (2015).

As concentrações de AFP podem estar elevadas em diferentes condições fetais, como nos defeitos de fechamento do tubo neural (NTD) (anencefalia, espinha bífida e encefalocele) em que ocorre a passagem de AFP como um transudato através de membranas e superfície de vasos sanguíneos fetais expostos; nas situações em que

ocorre a passagem de proteínas plasmáticas fetais para o LA através da pele (hidropsia fetal, defeitos da parede abdominal e cistos); digestão alterada da AFP (atresia esofágica, duodenal ou intestinal); onfalocele ou gastrosquise; rins defeituosos; dentre outras (PALOMAKI et al., 1988; MAESTRI et al., 1998; WYSZYNSKI, 2005).

Figura 7- Cariótipo fetal 46,XY.



Os cromossomos de um indivíduo são agrupados de acordo com o tamanho e padrão de bandeamento (banda GTG), permitindo a identificação de possíveis anomalias cromossômicas.

Fonte: do autor.

Os valores de AFP são usualmente expressos em Múltiplos de Mediana (MoM). O MoM é o valor observado dividido pelo valor esperado para determinada idade gestacional. Usualmente valores acima de 2,0 a 2,5 são considerados anormais (WYSZYNSKI, 2005).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo pode ser definido como uma alteração no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes que leva ao dano potencial. O balanço pró-oxidante/antioxidante pode ser alterado pelo aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), ou uma diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante. O termo coletivo EROs inclui

tanto espécies radicais como não- radicais de oxigênio que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais. O termo ERNs também é um termo coletivo que inclui espécies radicais e não- radicais de nitrogênio (figura 8) (CASANUEVA e VITERI, 2003; HALLIWELL, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Figura 8- Espécies reativas.

Espécies reativas de oxigênio (EROs)	
<i>Radicais</i>	<i>Não radicais</i>
Superóxido, O_2^{\bullet}	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroxil, $\bullet OH$	Ácido Hipocloroso, $HClO$
Peroxil, RO_2^{\bullet}	Ácido Hipobromoso, $HBrO$
Alcoxil, RO^{\bullet}	Ozônio, O_3
Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}	Oxigênio Singlete, 1O_2
Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	
<i>Radicais</i>	<i>Não radicais</i>
Óxido Nítrico (monóxido de nitrogênio), NO^{\bullet}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}	Cátion Nitrosil, NO_1^+
	Ânion Nitroxil, NO_2^-
	Dinitrogênio tetróxido, N_2O_4
	Dinitrogênio trióxido, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO_2$
	Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$
	Cátion Nitronium (nitril), NO_2^+
	(ex. como cloreto de nitrila, NO_2Cl)
	Alquil peroxinitrito, $ROONO$

Fonte: adaptado de Halliwell (2001).

Os radicais livres são espécies capazes de existir independentemente (daí o termo “livre”) formadas a partir de um ou mais elétrons não emparelhados na camada externa do átomo. Os elétrons não emparelhados são aqueles que estão sozinhos em um orbital e são responsáveis pela baixa estabilidade e alta reatividade dos radicais livres. Geralmente os elétrons estão associados aos pares na estrutura de átomos e moléculas, com cada elétron tendo um número quântico de rotação (spin) $+1/2$ e $-1/2$. Os valores de spin opostos dos dois elétrons no mesmo orbital garantem a estabilidade do sistema, pois cada elétron gira ao redor do próprio eixo, um em cada sentido, permitindo que o magnetismo de cada um seja anulado (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As EROs podem ser geradas a partir de fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas de EROs incluem mitocôndrias, peroxissomas e retículo endoplasmático, locais com elevado consumo de oxigênio. A maioria das EROs são derivadas da mitocôndria, com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) sendo gerado na cadeia transportadora de elétrons através da adição de 1 elétron ao oxigênio molecular. Cerca de 1 a 3% dos elétrons, da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, em vez de reduzirem o oxigênio em água (processo normal), escapam e produzem $O_2^{\bullet-}$. O $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , relativamente pouco reativos, ao interagirem com ferro ou cobre geram o $\bullet OH$. O $\bullet OH$ é a ERO mais reativa, podendo danificar proteínas, lipídios e DNA (BIRBEN et al., 2012; PHANIENDRA et al., 2015).

As fontes exógenas incluem fumo, hiperóxia, exposição ao ozônio, dentre outras. A fumaça do cigarro contém oxidantes, radicais livres e compostos orgânicos e a inalação desta fumaça no pulmão leva ao acúmulo de neutrófilos e macrófagos que posteriormente aumentam o dano oxidativo. A hiperóxia, níveis mais elevados de oxigênio do que a pressão parcial normal de oxigênio nos pulmões ou em outros tecidos corporais, leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A exposição ao ozônio poder causar peroxidação lipídica e aumento de neutrófilos no epitélio das vias aéreas, e a curto prazo, causar a liberação de mediadores inflamatórios, como a MPO (BIRBEN et al., 2012).

Diferentes mediadores inflamatórios, como os metabólitos de ácido araquidônico, citocinas (fator de necrose tumoral, interleucina-1, interleucina-6) e quimiocinas são liberados durante a resposta inflamatória. A resposta inflamatória é uma resposta inata do organismo ao dano tecidual, com o intuito de restaurar o tecido à condição íntegra anterior à lesão. A resposta inflamatória aguda envolve uma sequência organizada de eventos, sendo marcada inicialmente pela adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular. Os leucócitos migram para o local lesado, atraídos por mediadores inflamatórios, levando a um aumento da captação de oxigênio e conseqüente acúmulo de EROs no local da lesão (REUTER et al., 2010; SERHAN et al., 2010).

A MPO é uma enzima granulocítica sintetizada e secretada por neutrófilos e monócitos ativados, e tem um papel importante nas reações inflamatórias. Esta enzima faz a conversão do H_2O_2 , na presença de íon cloreto, em ácido hipocloroso (HClO) que é altamente oxidativo e desempenha um papel importante na defesa contra agentes patogênicos. Apesar dessa importante função, o HClO também pode causar dano ao reagir com o DNA e induzir interações DNA-proteína, produzir

produtos de oxidação de pirimidina e adicionar cloreto a bases do DNA. Além disso, a MPO também contribui para o estresse oxidativo por modificação de proteínas através da halogenação, carbonilação, nitração e ligação cruzada de proteínas (BUSS et al., 2000; BIRBEN et al., 2012; HUNG et al., 2012; SOUBHYE et al., 2016).

Quantidades elevadas de EROs e ERNs geram estresse oxidativo e nitrosativo respectivamente, levando a possíveis danos às biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA. A peroxidação lipídica ou reação do oxigênio com lipídeos insaturados produz uma grande variedade de produtos de oxidação. Os lipídios da membrana, especialmente os resíduos de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolípidos, são mais suscetíveis à oxidação por radicais livres, resultando em perda do funcionamento da membrana. Os principais produtos primários da peroxidação lipídica são os hidroperóxidos lipídicos (ROOH) e entre os diversos aldeídos que podem ser formados como produtos secundários, está o malondialdeído (MDA). O MDA tem sido amplamente utilizado como um biomarcador conveniente para a peroxidação lipídica devido à fácil reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O teste TBARS é baseado na reatividade do TBA com o MDA gerando um cromógeno fluorescente vermelho intensamente corado (AYALA et al., 2014; PHANIENDRA et al., 2015).

Os aminoácidos, tanto livres como em proteínas, são um alvo para danos oxidativos, que podem ser induzidos por $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, radical peroxil, radical alcóxil, radical hidroperoxil, H_2O_2 , O_3 , HOCl, oxigênio singlete e $OONO^-$. Os aminoácidos das proteínas ao sofrerem oxidação pelas EROs, formam ligações cruzadas de proteína-proteína, com consequente desnaturação e perda de função proteica, perda de atividade enzimática, perda de função dos receptores e proteínas de transporte (PHANIENDRA et al., 2015). A prolina, arginina, lisina e treonina são particularmente vulneráveis à oxidação direta das cadeias laterais, formando grupos carbonil (aldeídos e cetonas) (BURTON e JAUNIAUX, 2011). As concentrações plasmáticas de proteína carbonilada, considerada marcador da oxidação proteica mediada por EROs, podem ser dosadas pelo método de Levine e colaboradores (1990) que determina o conteúdo de carbonil em proteínas oxidativamente modificadas.

Tanto EROs quanto ERNs podem causar danos oxidativos aos ácidos nucleicos. A ERO mais importante no ataque ao DNA é o radical $\bullet OH$, reagindo diretamente com diferentes componentes do DNA, como reações com as bases purina e pirimidina ou com os açúcares da desoxirribose. Os ataques nas porções de açúcar podem causar a

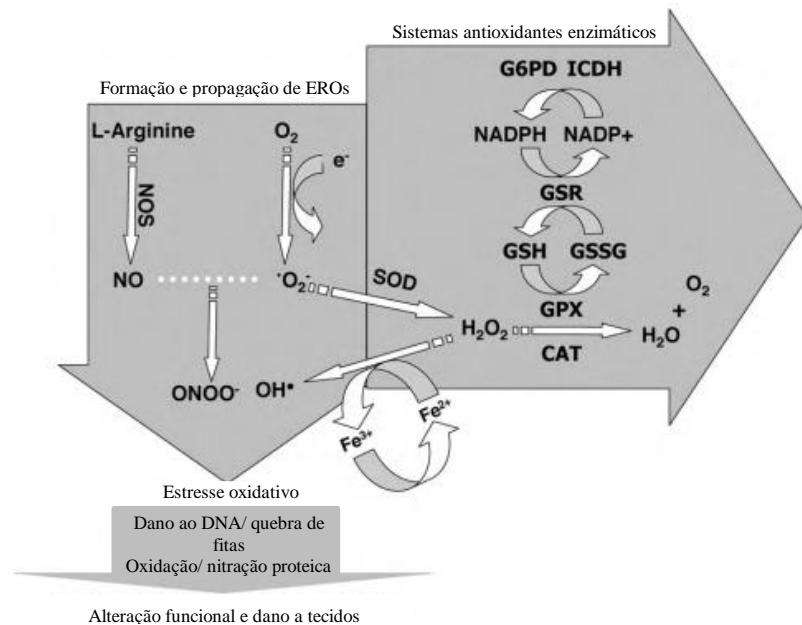
rupturas de cadeias e os ataques a proteínas de histonas podem levar a ligações cruzadas que interferem no dobramento da cromatina, reparo do DNA e transcrição. Podendo assim, resultar em mutação ou expressão de gene aberrante (BURTON e JAUNIAUX, 2011). O DNA mitocondrial, por estar localizado próximo ao local gerador das EROs, fica mais vulnerável ao ataque de EROs do que o DNA nuclear. A 8-hidroxi desoxiguanosina (8-OHdG) é considerada um biomarcador do dano oxidativo ao DNA, com concentrações mais elevadas no DNA mitocondrial do que no DNA nuclear (PHANIENDRA et al., 2015).

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é balanceada com sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (figura 9). Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, tais como vitaminas (vitaminas C e E), β -caroteno, ácido úrico e glutatona reduzida (GSH). A GSH é o principal antioxidante solúvel e está presente em todos os compartimentos celulares. Os principais antioxidantes enzimáticos são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX). A SOD é de extrema importância para a célula, pois acelera a conversão de superóxido em H_2O_2 . A catalase, um tetrâmero composto por 4 monômeros idênticos, cada um dos quais contém um grupo heme no local ativo, é capaz de reduzir o H_2O_2 em água e O_2 . Porém, ainda mais importantes na redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos lipídicos são as GPX, uma classe de enzimas tetraméricas que requer selênio para a ação. Por meio das GPX, o H_2O_2 é removido através da oxidação da GSH em glutatona oxidada (GSSG). A GSSG é regenerada em GSH pela glutatona redutase (GSR) que usa a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como o doador de elétrons. O esgotamento da glutatona reduzida ou da glutatona peroxidase está associado à redução da capacidade antioxidante, resultando em peroxidação de lipídios, DNA e proteínas, acúmulo de toxinas e morte celular (HALLIWELL, 2001; BIRBEN et al., 2012).

O oxigênio, através da geração de EROs, causa efeitos potencialmente prejudiciais para os sistemas biológicos como citado anteriormente, porém também participa de funções essenciais do metabolismo celular normal. As EROs e ERNs participam de diversos processos fisiológicos como vias de sinalização celular, resposta mitogênica, regulação redox e função imune. Além disso, os processos biológicos que dependem de O_2 e nitrogênio ganham maior importância porque os produtos finais formados a partir deles são geralmente encontrados em estados de altas exigências metabólicas, tais como processos patológicos ou interações ambientais externas

(BURTON e JAUNIAUX, 2011; AGARWAL et al., 2012; PHANIENDRA et al., 2015).

Figura 9- Representação esquemática da produção de espécies reativas e principais vias enzimáticas antioxidantes celulares.



A produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) através da doação de elétrons para oxigênio molecular (O_2) inicia a formação e propagação de EROs, levando a uma cascata de outras EROs. As células mantêm uma variedade de mecanismos antioxidantes para controlar a produção e propagação de EROs. As principais enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona redutase (GSR), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e isocitrato desidrogenase (ICDH) representam a rede de defesa contra as alterações induzidas pelo estresse oxidativo e danos aos tecidos. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2); água (H_2O); radical hidroxil ($^{\bullet}OH$); peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$); óxido nítrico sintase (NOS); óxido nítrico (NO); glutaciona reduzida (GSH); glutaciona oxidada (GSSG); nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH); nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺).

Fonte: adaptado de Al-Gubory (2010).

Durante a gestação, o estresse fisiológico e metabólico aumenta devido ao aumento das demandas metabólicas exigidas pelo feto em

crescimento (BUKHARI et al., 2011). Neste período, as mulheres são mais propensas ao estresse oxidativo (CASANUEVA e VITERI, 2003), uma vez que estudos demonstraram um aumento dos produtos de oxidação lipídica e proteica no período gestacional tardio (ZUSTERZEEL et al., 2000; PATIL et al., 2007; ATIBA et al., 2014). Hung e colaboradores (2010) relataram que além do aumento de pró-oxidantes, ocorrem também um aumento das defesas antioxidantes garantindo o equilíbrio fisiológico. Estudos sugerem que a atividade inflamatória leve também está envolvida no desenvolvimento de uma gravidez normal, como o aumento plasmático de proteína c reativa (PCR) (FIALOVA et al., 2006), interleucina-6 (IL-6) e aumento urinário de prostaglandina-F2 α (PGF2 α) (PALM et al., 2013).

Em revisão da literatura Agarwal e colaboradores (2012) e Burton e Jauniaux (2011) reconheceram o papel central do estresse oxidativo na fisiopatologia de diferentes distúrbios, incluindo complicações da gravidez como aborto espontâneo, perda de gravidez recorrente, pré-eclâmpsia e de crescimento intra uterino restrito (CIUR). O estresse oxidativo também foi associado às gestantes com malformação fetal, com diversos estudos em modelos animais demonstrando o envolvimento do estresse oxidativo na malformação fetal relacionada ao diabetes mellitus materno (LOEKEN, 2004). Com os estudos em modelos animais de diabetes pré-gestacional, Loeken e colaboradores (2004), em revisão da literatura, sugeriram que outros fatores como o uso de medicamento (ex.: talidomida), radiação e deficiência de ácido fólico também podem levar ao aumento de estresse oxidativo em momentos críticos do desenvolvimento, gerando um risco aumentado no aparecimento dos mesmos defeitos congênitos que aparecem no diabetes mellitus pré-gestacional.

Com relação à embriopatia diabética, uma rede complexa de vias bioquímicas são influenciadas pelo excesso do metabolismo da glicose no embrião em desenvolvimento em decorrência da hiperglicemia materna. Esse ambiente hiperglicêmico leva a, pelo menos, três eventos inter-relacionadas: alterações no metabolismo lipídico celular; disfunção mitocondrial com excesso de EROs; ativação das cascatas de sinalização para a morte celular programada (apoptose). A combinação destes eventos pode levar a apoptose celular (REECE, 2012; ORNOY et al., 2015).

2.5 INSTABILIDADE GENÔMICA

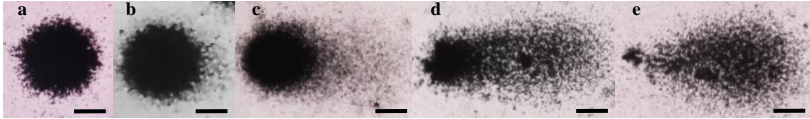
Cada uma das aproximadamente 10^{13} células do corpo humano recebe diariamente dezenas de milhares de lesões no DNA. Estas lesões podem bloquear a replicação e transcrição do genoma e, se não forem reparadas ou reparadas incorretamente, levam a mutações ou aberrações do genoma, ameaçando a viabilidade celular ou do organismo. Dano ao DNA pode ser causado por EROs, que ao atacar o DNA, podem prejudicar o pareamento de bases e a transcrição e replicação do DNA, levar à perda de base ou a quebras de fita simples de DNA (JACKSON e BARTEK, 2009).

Estas lesões ao DNA podem conduzir à formação de rupturas de fita simples (SSBs) ou de fita dupla (DSBs). O reparo do DNA é extremamente importante na manutenção da integridade dos organismos, garantindo a estabilidade genômica. As SSBs podem ser reparadas pela via de reparo por excisão de bases ou via de reparo por excisão de nucleotídeos, sendo a lesão removida e a sequência do DNA original restaurada pela enzima DNA polimerase, utilizando a fita não danificada como molde. As DSBs são lesões citotóxicas, que se deixadas sem reparo poderiam levar a instabilidade genômica, câncer e até mesmo morte celular. São lesões mais perigosas, já que as duas fitas da dupla hélice do DNA são quebradas, não restando nenhuma fita molde intacta para o reparo. Assim, as vias de reparo não são consideradas livres de erro e a reparação errônea de DSBs pode levar a rearranjos cromossômicos e perda de heterozigiosidade. Embora o reparo de DSBs seja crucial para a manutenção da integridade do genoma, o processo de reparo precisa ser bem regulado e monitorado de perto. As duas vias mais comumente utilizadas para reparar DSBs em eucariotos superiores incluem a junção de extremidades não-homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR). NHEJ é considerada propensa a erros, uma forma rápida de correção para selar as pontas de DNA quebrados e reiniciar a replicação. Em contraste, HR é um processo de alta fidelidade (BHATTACHARJEE e NANDI, 2016; KIM et al., 2016; CALDECOTT, 2008).

Os ensaios cometa e micronúcleos com bloqueio da citocinese celular - citoma (CBMN - citoma) são os mais utilizados na avaliação da instabilidade genômica, por permitirem a avaliação de possíveis efeitos deletérios no DNA. O teste do cometa, é uma técnica rápida e sensível para medir sítios sensíveis ao pH alcalino (alcali-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos. Os danos ao DNA observados neste teste ainda são passíveis de reparo (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

As células são colocadas em agarose e submetidas à eletroforese. Desta maneira, observa-se uma espécie de cauda, que se forma nas células danificadas. Essa cauda é formada pelo DNA solto do núcleo, por quebras de cadeia simples ou dupla, com o comprimento diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado (figura 10) (SINGH et al., 1988).

Figura 10- Diferentes classes de dano observadas na técnica do cometa.

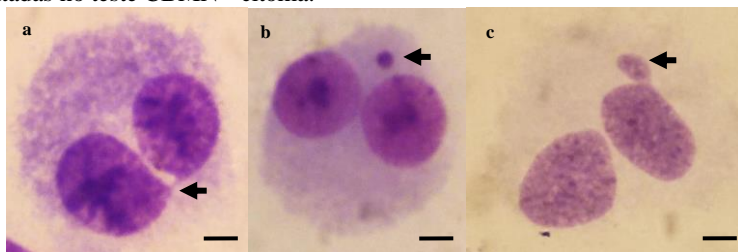


a: dano 0 (sem dano); **b:** dano 1 (dano mínimo); **c:** dano 2 (dano médio); **d:** dano 3 (dano intenso); **e:** dano 4 (dano máximo); barras representam 6 µm.

Fonte: do autor.

A técnica CBMN em cultura de linfócitos do sangue periférico foi descrita por Fenech e Morley em 1985 e revisada por Fenech em 2007. O ensaio CBMN - citoma permite medir danos no DNA, citostase e citotoxicidade. Neste ensaio, as células binucleadas (BN) que passaram por um ciclo de divisão celular são utilizadas para avaliar eventos de dano ao DNA, incluindo micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (NPBs) e *buds* nucleares (NBUDs). O MN é um biomarcador de quebra cromossômica e/ou perda cromossômica completa, a NPB um biomarcador de reparo errôneo do DNA e/ou fusões finais teloméricas e NBUDs biomarcador de eliminação de DNA amplificado e/ou complexos de reparo do DNA (figura 11). O índice de divisão nuclear (IDN) mede os efeitos citostáticos através da proporção de células mono-, bi- e multinucleadas e a citotoxicidade pode ser avaliada através de razões de células necróticas e/ou apoptóticas. A Figura 12 mostra os diferentes destinos celulares possíveis encontrados nesta técnica (FENECH, 2007).

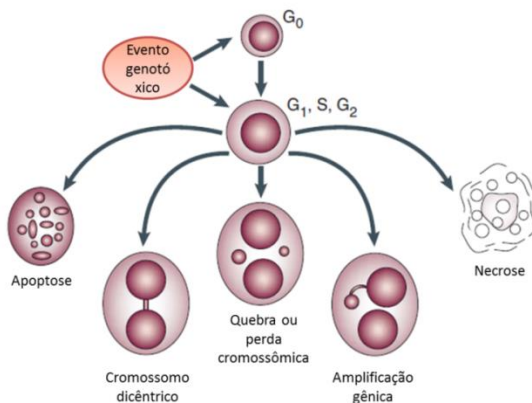
Figura 11- Fotomicrografias de células binucleadas com diferentes alterações contadas no teste CBMN - citoma.



a: célula binucleada, seta indica a ponte nucleoplasmática (NPB); **b:** célula binucleada, seta indica o micronúcleo (MN); **c:** célula binucleada, seta indica o *bud* nuclear (NBUD); barras representam 4 µm.

Fonte: do autor.

Figura 12- Diferentes destinos possíveis encontrados nas células em cultura com bloqueio da citocinese.



Fonte: adaptado de Fenech (2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar marcadores de estresse oxidativo e de dano de DNA, assim como as concentrações de alfafetoproteína, em gestantes com malformação fetal, gestantes e mulheres não gestantes, correlacionando os resultados com as características clínicas e o resultado do cariótipo fetal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações de alfafetoproteína no líquido amniótico;
- Avaliar marcadores de dano de DNA no sangue periférico de gestantes com malformação fetal, gestantes e mulheres não gestantes;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em gestantes com malformação fetal, gestantes e mulheres não gestantes;
- Correlacionar os marcadores de dano de DNA e estresse oxidativo com cariótipo fetal;
- Correlacionar os marcadores de dano de DNA e estresse oxidativo com os hábitos de vida das participantes do estudo;
- Validar a técnica do cometa em amniócitos provenientes de amostras de líquido amniótico.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 DESENHO AMOSTRAL

O estudo transversal avaliou marcadores de estresse oxidativo e instabilidade genômica no sangue periférico de gestantes com malformação fetal, gestantes e mulheres não gestantes. O programa WinPepi 8.0 foi utilizado para realização do cálculo amostral, considerando a variação normalmente encontrada nas técnicas utilizadas para um nível de significância de 0,05 e o resultado encontrado foi de uma amostra mínima de 78 indivíduos com 26 em cada grupo. Todas as participantes assinaram e receberam uma cópia do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (ANEXO II e/ou III). Além disso, foi aplicado o “Questionário de Saúde Pessoal” adaptado da Comissão Internacional de Proteção a Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (ICPEMC) (CARRANO e NATARAJAN, 1988) (ANEXO I).

As gestantes que pertenciam ao ambulatório de pré-natal de alto risco fetal e medicina fetal da maternidade do HU-UFSC que se beneficiaram da coleta de líquido amniótico para o diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas foram convidadas a participar deste trabalho. Como critérios de inclusão para a coleta de líquido amniótico (amniocentese genética) foram estabelecidas as seguintes condições: ter mais de 18 anos de idade; mais de 15 semanas de gestação; ter alterações na morfologia fetal à ultrassonografia que possam estar associadas a anomalias cromossômicas; como pré-requisito para procedimentos cirúrgicos intra-uterinos, como colocação de balão endotraqueal em hérnias diafragmáticas e cirurgia de mielomeningocele; casos de alterações na morfologia fetal à ultrassonografia incompatíveis com a vida do ponto de vista bioético; auxiliar no aconselhamento genético para planejamento de futuras gestações; e consentir, após discussão e assinatura de TCLE, em realizar o procedimento invasivo para diagnóstico cromossômico fetal.

Os critérios de inclusão do grupo de gestantes foram: ter mais de 18 anos de idade, estar com mais de 15 semanas de gestação e assinar o TCLE. Os critérios de inclusão do grupo de mulheres não gestantes foram: ter mais de 18 anos de idade, estar em idade fértil, não ter doenças crônicas conhecidas, não estar gestante, assinar o TCLE. Como critérios de exclusão do grupo de gestantes com malformação fetal: não apresentar malformação ao nascer. Como critérios de exclusão do grupo de gestantes: apresentar malformação fetal ao nascer.

Foram incluídas neste estudo 32 gestantes com malformação fetal (GMF), com a maioria das malformações fetais confirmadas por ultrassonografia durante a gestação, apenas um caso entrou neste grupo, realocado do grupo controle, após o nascimento quando teve o diagnóstico de malformação (diagnóstico: sequência de Pierre Robin); 35 gestantes (G), sendo que duas gestantes deste grupo vieram realocadas do grupo de gestantes que realizaram a amniocentese genética, uma por idade materna elevada e outra por translucência nucal aumentada, mas as duas apresentaram cariótipo fetal normal e não apresentaram nenhum tipo de malformação ao nascer; e 34 mulheres em idade fértil (MNG) (figura 13). Foram coletadas amostras de gestantes entre 16 e 33 semanas de gestação, sendo que as amostras compreendidas entre 14 e 27 semanas completas foram consideradas como segundo trimestre gestacional e as coletas realizadas com 28 semanas completas ou mais foram consideradas como terceiro trimestre gestacional (DREHMER et al., 2013).

Figura 13- Esquema amostral.

<p>Gestantes com malformação fetal (n = 32)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • > 18 anos; • > 15 semanas de gestação; • malformação fetal confirmada à ultrassonografia ou ao nascimento; • assinar o TCLE.
<p>Gestantes (n= 35)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • > 18 anos; • > 15 semanas de gestação; • ausência de malformação fetal; • assinar o TCLE.
<p>Mulheres não gestantes (n= 34)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • > 18 anos; • estar em idade fértil; • não ter doenças crônicas conhecidas; • não estar gestante; • assinar o TCLE.

Fonte: do autor.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o Número do Parecer 1.722.502.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

O líquido amniótico foi recuperado por amniocentese transabdominal por profissional médico habilitado. A coleta foi realizada sob condições antissépticas, utilizando uma agulha de calibre 20 a 22 G monitorada por ultrassom. Em torno de 20 mL de líquido amniótico, dividido em duas seringas, foi coletado de cada gestante com indicação médica de realização de cariótipo fetal. As amostras foram transportadas ao laboratório clínico em seringa estéril tampada e à temperatura ambiente.

Amostras de sangue periférico foram obtidas através de punção venosa periférica, sob devidas condições antissépticas. Foram coletados 1 tubo de 4 mL com o anticoagulante EDTA e 1 tubo de 4 mL com o anticoagulante heparina (protegido da luz imediatamente após a coleta). As amostras foram transportadas ao laboratório em isopor contendo gelo reciclável.

4.3 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

Ao chegarem ao laboratório, as amostras de líquido amniótico, foram utilizadas para a realização da técnica do cariótipo fetal. Uma alíquota de aproximadamente 2 mL foi separada para a realização da técnica do cometa e análise de contaminação com sangue materno através da contagem de hemácias em câmara de Neubauer. O sobrenadante restante da técnica do cariótipo foi encaminhado para a realização de alfafetoproteína.

Com relação às amostras de sangue periférico, o tubo com heparina foi utilizado para a realização dos ensaios de instabilidade genômica e o tubo com EDTA para as demais análises. O tubo com EDTA foi submetido ao seguinte fracionamento: o sangue total foi submetido à centrifugação (500 g, por 4 min), permitindo a separação do plasma e dos eritrócitos; os eritrócitos foram lavados duas vezes com solução salina (centrifugação de 500 g, por 4 min) e lisados com água destilada (diluição 1:5, v:v). O plasma foi imediatamente estocado em nitrogênio líquido (aproximadamente 170°C negativos) e o hemolisado em freezer -80°C.

Durante a realização das diferentes análises ocorreram perdas pontuais de amostras por problemas em alguma das técnicas e impossibilidade de repetição da análise. A impossibilidade de repetição ocorreu por perda de estabilidade da amostra ou por volume insuficiente para a repetição do ensaio. Com isso, os resultados foram descritos acompanhados do número de amostras (n) analisadas para cada ensaio.

4.3.1 Ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular - citoma (CBMN - citoma)

Esta técnica foi adaptada da técnica descrita por Fenech (2007). Foi adicionado, de forma estéril, em cabine de segurança biológica, 0,5 mL de sangue heparinizado em 5 mL de meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 2% fitohemaglutinina). O tubo falcon, contendo a mistura de amostra e meio de cultura, foi incubado por 72 h, a 37°C. Após 44 h em cultura, foi acrescentado citocalasina B (5 µg/ mL de cultura) de forma estéril. Ao completar 72 h em cultura, procedeu-se a retirada da cultura celular. Os tubos falcon foram centrifugados a 300 g por 6 min e após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 5 mL de KCl (0,075 M). O KCl permaneceu em contato com a amostra por 7 min, sendo em seguida adicionado 0,5 mL de fixador (metanol:ácido acético - 3:1, v:v), feita a homogeneização e centrifugação (300 g por 6 min). O sobrenadante foi novamente retirado e foi adicionado aos poucos, com cuidadosa homogeneização, 5 mL de fixador. A amostra ficou em geladeira por 10 min e em seguida foi centrifugada a 300 g por 6 min. O passo da retirada do sobrenadante e adição do fixador foi repetido no mínimo mais uma vez. Ao se observar o sobrenadante límpido, foi deixado 1 mL do sobrenadante no tubo e o material foi ressuspenso. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas pingando três gotas do material sobre a lâmina (previamente lavada e deixada no congelador por alguns minutos para formar uma camada de gelo e permitir o espalhamento do material). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de giemsa (10%) por 5 min.

As análises foram realizadas de forma cega por um único observador, utilizando-se microscopia óptica (Nikon Optiphot-2) com aumento de 200 vezes e confirmação das estruturas em aumento de 1000 vezes. Foram avaliadas 1000 células binucleadas (500 células em cada uma das duas lâminas confeccionadas por amostra) para os seguintes eventos: micronúcleos (MN), *buds* nucleares (NBUD) e pontes

nucleoplasmáticas (NPB). Para a obtenção do índice de divisão nuclear (IDN) foram contadas 500 células viáveis, avaliando a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos. O cálculo do IDN foi obtido através da fórmula $IDN=(M1+2M2+3M3+4M4)/N$, onde M1 a M4 representam o número de células com 1 a 4 núcleos e N é o número total de células viáveis (excluindo células necróticas e apoptóticas). O número de células necróticas e apoptóticas foi avaliado durante a contagem das 500 células viáveis.

4.3.2 Técnica do cometa

Esta técnica foi realizada conforme a técnica descrita por Singh e colaboradores em 1988 e adaptada por Tice e colaboradores (2000). Inicialmente foram preparadas as lâminas com pré-cobertura de agarose regular 0,75%, utilizadas após secagem de no mínimo duas horas. Ao abrigo da luz, em *ependorf*, foi misturado 5 μ L de sangue periférico heparinizado ou 5 μ L do pellet do líquido amniótico (líquido amniótico centrifugado a 300 g por 6 min e retirado o sobrenadante) com 95 μ L de agarose de baixo ponto de fusão 0,7% à 37°C. Esta mistura foi imediatamente aspirada e disposta sobre a lâmina com pré cobertura de agarose. Em seguida foi colocada uma lamínula 24 x 50 mm sobre a mistura agarose/amostra. A lâmina com a lamínula ficou em câmara úmida horizontal na geladeira por 5 minutos e após o endurecimento da agarose, a lamínula foi retirada e a lâmina armazenada em cubeta vertical contendo solução de lise gelada [89 mL de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton x-100] por no mínimo 24 h e no máximo 7 dias. As lâminas foram expostas por 20 min ao tampão alcalino gelado (NaOH, EDTA 200 nM e água destilada, pH > 13) e em seguida submetidas a eletroforese realizada em geladeira, por 20 min, 25 V e 300 mA, com o cuidado de não deixar brechas entre as lâminas. Após a eletroforese, as lâminas foram tratadas com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 min, três vezes e em seguida lavadas com água destilada duas vezes. Após no mínimo 2 horas de secagem, as lâminas foram fixadas (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%) por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada. Novamente após no mínimo 2 horas de secagem as lâminas foram coradas. A coloração foi realizada seguindo o método descrito por Nadin e colaboradores (2001). A mistura das soluções corantes A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrito de amônio 0,02%, nitrito de prata

0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) foi feita imediatamente antes do uso e as lâminas ficaram imersas nesta solução por aproximadamente 10 minutos. Assim que observada a coloração acinzentada nas lâminas, estas foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%) por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e após secagem à temperatura ambiente, foram analisadas.

Para a análise, de forma cega por um único observador, foi utilizado o aumento de 200 vezes em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2), sendo contadas 100 células por amostra (50 células em cada uma das duas lâminas confeccionadas por indivíduo). Cada célula foi classificada segundo a classe de dano observada e pontuada de 0 a 4 de acordo com a intensidade do dano formado. As células sem migração de fragmentos na eletroforese, ou seja, sem dano, receberam a pontuação 0; células com danos mínimos, receberam pontuação 1 (C1); células com danos médios, receberam pontuação 2 (C2); células com danos intensos, receberam pontuação 3 (C3) e células com danos máximos, receberam pontuação 4 (C4). O cálculo do índice total de dano (ITD) foi obtido através da fórmula $ITD = C1 + 2C2 + 3C3 + 4C4$. O ITD pode variar de 0 a 400 unidades (COLLINS et al., 2008).

4.3.3 Cariótipo fetal

As amostras de líquido amniótico coletadas em seringas foram transferidas para 2 tubos cônicos (10 mL) e centrifugadas a 300 g, por 6 min. O sobrenadante foi retirado e ao pellet de cada tubo cônico foi adicionado 4 mL de meio de cultura AmnioMax Complete (GIBCO) à 37°C. A mistura foi colocada em um frasco de cultura ventilado e incubado em estufa de cultura com 5% de CO₂, a 37°C, por aproximadamente 10 a 15 dias até atingirem a confluência celular adequada para posterior análise. Após o 5º dia de cultura, os frascos foram examinados diariamente no microscópio invertido sempre verificando a aderência ao fundo do frasco e o crescimento celular. Duas vezes por semana o meio de cultura consumido foi descartado, e 4 mL de meio de cultura novo à 37°C foram adicionados. Após atingir a confluência celular adequada, foi adicionado à cultura 60 µL de colchicina (0,2 µg/ mL de cultura), com posterior incubação na mesma estufa por 45 min. Após o tempo de incubação da colchicina, o meio de cultura foi retirado e colocado em um tubo cônico. Foi adicionado 1,0 mL da solução de tripsina (0,25%)/ EDTA (0,03%) (previamente

aquecida a 37°C) à garrafa de cultura, que após breve homogeneização foi unida ao meio de cultura colocado no tubo cônico. Foi adicionado mais 1,0 mL da mesma solução de tripsina na garrafa de cultura, que desta vez permaneceu em contato com as células por aproximadamente 40 seg. Durante este curto período, a garrafa de cultura foi alternada entre a chapa aquecida (40°C) e microscópio invertido. Assim que observada a soltura das células, algumas que por ventura ainda ficaram aderidas, foram soltas com a ajuda mecânica através de algumas batidas do frasco na bancada. A tripsina, juntamente com as células, foi transferida para o mesmo tubo cônico contendo o meio de cultura. Este tubo foi centrifugado por 6 min a 300 g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 2 mL de KCl (0,075 M). O KCl permaneceu em contato com a amostra por 11 min, seguido da adição de 0,5 mL de fixador (metanol:ácido acético – 3:1, v:v), homogeneização e centrifugação (300 g por 6 min). O sobrenadante foi novamente retirado e foi adicionado aos poucos, com cuidadosa homogeneização, 2 mL de fixador. A amostra ficou em geladeira por 10 min e em seguida foi centrifugada a 300 g por 6 min. O passo da retirada do sobrenadante e adição do fixador foi repetido no mínimo mais uma vez. Em seguida, para a confecção das lâminas, foi adicionado em torno de 0,5 mL de fixador no tubo contendo o pellet com as células. O material foi ressuspensionado e as lâminas foram confeccionadas pingando três gotas do material sobre a lâmina (previamente lavada e deixada no congelador por alguns minutos para formar uma fina camada de gelo e permitir o espalhamento do material). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram submetidas ao bandeamento cromossômico pela técnica de banda GTG, expondo as lâminas à solução de tripsina (0,1%) por aproximadamente um segundo, sendo rapidamente inativadas (solução de PBS/ água destilada (1:1) com poucas gotas de SFB), lavadas em água destilada e, em seguida, coradas com solução de Giemsa (10%) por 3 min (GUS, 2011; MIRANDA e MATTEVI, 2011).

As análises foram realizadas através da captura das imagens das metáfases observadas em microscopia óptica (Olympus CX41), com aumento de 1000 vezes. Aproximadamente 20 metáfases foram analisadas por caso, sendo os cromossomos agrupados de acordo com o tamanho e bandeamento para permitir a verificação numérica e estrutural. Foi utilizado o sistema GeneAll® da Qualiterm para captura e montagem do cariótipo.

4.3.4 Peroxidação lipídica (TBARS)

O ensaio foi realizado segundo o método de Bird e Draper (1984). Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético 12% (TCA) e 100 μL de plasma. Em seguida, procedeu-se a homogeneização em vórtex, com posterior adição de 0,9 mL de tampão Tris-HCl 60 nM, pH 7,4 (0,1 mM DTPA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,73%. Após nova homogeneização, o tubo foi incubado a 100 °C em banho-maria por 1 hora. Ao final, os tubos foram resfriados em banho de gelo e centrifugados a 500 g por 5 minutos. Para a leitura, foram transferidos 200 μL do sobrenadante de cada amostra para uma microplaca, com leitura em 535 nm em espectrofotômetro. O resultado foi expresso em $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em duplicata.

4.3.5 Proteína Carbonilada (PC)

Este ensaio foi realizado segundo método de Levine e colaboradores (1990). Foram misturados 600 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e 50 μL de plasma em tubos do tipo eppendorf, com posterior homogeneização em vórtex e incubação por 1 h sob agitação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, acrescentou-se 600 μL de TCA 20% e procedeu-se a homogeneização em vortex e incubação em gelo por 10 min. Foi realizada nova centrifugação a 800 g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. A lavagem do pellet foi realizada acrescentando-se 600 μL de etanol:acetado de etila (1:5; v:v) utilizando vórtex para auxílio na homogeneização, seguida de nova centrifugação a 800 g por 5 min e retirada do sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem foi adicionado 800 μL de guanidina ao pellet, com posterior incubação a 37°C por 60 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (800 g por 5 min) e 200 μL do sobrenadante foram pipetados em microplaca, permitindo a leitura em espectrofotômetro em 360 nm. Para realização do cálculo de proteína carbonilada, foram dosadas as proteínas totais de cada amostra, segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma curva padrão de albumina. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$.

4.3.6 Catalase (CAT)

Este ensaio foi realizado segundo método de Aebi (1984), que avalia capacidade da enzima presente na amostra em decompor o peróxido de hidrogênio. Foram adicionados 5 μL de hemolisado (diluição 1:80, v:v) e 200 μL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 10 mM, em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0) preparada no dia da análise, em cada poço da microplaca. Imediatamente após a adição da solução de peróxido de hidrogênio realizou-se a leitura da queda da absorbância a 240 nm durante 5 min (SpectraMax Paradigm). As análises foram feitas em triplicata. Os valores foram expressos em $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.3.7 Mieloperoxidase (MPO)

Este ensaio foi realizado segundo método de Rao e colaboradores (1993). Foram adicionados 20 μL de plasma em poços de microplacas contendo 150 μL da solução reagente (0,167 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *o*-dianisidina 2HCl, 0,0005% de H_2O_2 , H_2O destilada e NaH_2PO_4 50 mM). Após 10 minutos, foi acrescentado 30 μL de azida sódica 1%. Após 5 minutos de incubação, foi obtida a leitura da absorbância em 450 nm (Thermo Plate, Leitora de microplaca TP-Reader). Os resultados foram comparados com uma curva-padrão de atividades conhecidas de MPO (0,7 a 140 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo expressos em $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram feitas em triplicata.

4.3.8 Alfafetoproteína (AFP)

Este ensaio foi realizado pelo setor de bioquímica da divisão de análises clínicas do HU/ UFSC. Após a separação do conteúdo celular para a realização do cariótipo fetal, o sobrenadante do líquido amniótico foi utilizado para a realização deste ensaio. A concentração de alfafetoproteína foi determinada através de kit comercial da Siemens®, utilizando o equipamento Advia Centaur. Consiste em um imunoenensaio em "sanduíche", que utiliza tecnologia quimioluminométrica direta. O equipamento misturou 10 μL de amostra, 50 μL de reagente Lite (anticorpo anti-AFP policlonal purificado de coelho marcado com éster de acridina) e 250 μL da fase sólida (anticorpo anti-AFP monoclonal de rato covalentemente associado a partículas paramagnéticas), e manteve em incubação por 7,5 minutos a 37°C. Em seguida, as cuvets foram separadas, aspiradas e lavadas com água reagente. Para iniciar a reação

de quimioluminescência, 300 µL de reagente ácido e 300 µL de reagente alcalino foram adicionados. A reação resultante foi medida como unidades de luz relativa (URLs), uma vez que existe uma relação direta entre a quantidade de AFP na amostra e as URLs detectadas pelo sistema óptico do equipamento. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados deste estudo foi realizada através do programa IBM SPSS 21.0. Para a avaliação da normalidade utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov de acordo com o tamanho do grupo analisado. Para as comparações entre os grupos foi utilizado o teste mais adequado para cada caso, assim, de acordo com o tipo de distribuição da amostra foi utilizado teste t ou Mann-Whitney U. A mesma premissa foi utilizada para a aplicação dos testes de correlação nos dados quantitativos, selecionando o teste de correlação de Pearson ou Spearman de acordo com o tipo de distribuição da amostra. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados de AFP no LA foram expressos em múltiplos da mediana (MoM) a partir dos valores fornecidos pelo fabricante do kit diagnóstico ou da regressão em \log_{10} das medianas utilizando o programa Microsoft Excel 2010, sem os outliers. Foram considerados outliers os casos que ficaram acima de $S = Q3 + 1,5 \cdot \text{IQR}$ ou abaixo de $I = Q1 - 1,5 \cdot \text{IQR}$, onde S: limite superior, I: limite inferior, IQR: Interquartil.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os grupos de gestantes com malformação fetal (GMF), gestantes (G) e mulheres não gestantes (MNG) apresentaram semelhança de idade e de idade gestacional. Ao dividir os grupos de gestantes por trimestre gestacional (segundo e terceiro trimestre) também foi observada semelhança entre os diferentes trimestres dos diferentes grupos. Outras características como grupo étnico, estado civil, ingestão diária de café, histórico de fumo, primigesta, dificuldade para engravidar, abortos prévios e filhos prematuros também foram considerados e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Caracterização da amostra.

	Gestantes com malformação fetal (n: 32)	Gestantes (n: 35)	Mulheres não gestantes (n: 34)
Idade (anos) (média±DP)	29,8±7,0	28,9±4,9	27,5±5,7
Idade gestacional (semanas) (média±DP)	25,2±4,9	25,8±4,3	_____
Grupo étnico (%)			
Caucasiano	78,1	82,9	91,2
Afrodescendente	12,5	8,6	0
Outros	9,4	8,6	8,8
Estado civil (%)			
Casada/ União estável	69,0	79,4	18,2
Solteira	24,1	20,6	81,8
Divorciada	6,9	_____	_____
Ingestão diária de café (%)	72,4	62,8	71,0
Histórico de fumo (%)	20,7	31,4	12,5
Primigesta (%)	53,1	85,7	_____
Dificuldade para engravidar (%)	20,7	8,6	_____
Abortos prévios (%)	24,1	11,4	_____
Filhos prematuros (%)	6,9	0	_____

DP: desvio padrão.

Fonte: do autor.

Com relação ao grupo de gestantes com malformação fetal, o cariótipo fetal realizado a partir de amostras de líquido amniótico indicou que alguns fetos apresentaram alguma alteração cromossômica, enquanto outros, apesar da anormalidade estrutural observada ao ultrassom, apresentaram cariótipo normal. Os diferentes tipos de alteração fetal observados por ultrassonografia e a presença ou ausência de cariótipo fetal alterado estão descritos na tabela 2.

Tabela 2- Características das gestações com malformação fetal em relação ao cariótipo fetal.

Tipo de alteração fetal observada à ultrassonografia	Cariótipo do líquido amniótico (n)	
	Normal	Anormal
Onfalocele	3	-
Malformação cardíaca	8	1 (47,XX,+21) 1 (46,XX,del(4)(p15)) 1 (47,XY,+13,inv(9)(p12q13))
Mais de um tipo de malformação*	5	2 (47,XY,+21) 5 (47,XY,+18)
Outros**	3	1 (47,XY,+21)

*: inclui a combinação de dois ou mais dos seguintes achados ultrassonográficos: malformação cardíaca, pés em mata-borrão, contratura dos membros, hipoplasia óssea, hipotelorismo (aproximação da distância entre as órbitas), cisto de plexo coroide, redução da circunferência cefálica, irregularidade óssea da calota craniana, higroma cístico, língua protrusa, holoprosencefalia (conjunto de displasias crânio-faciais e encefálicas), probóscide (nariz é substituído por um apêndice tubular), displasia renal, onfalocele, ascite e atresia duodenal (obstrução do duodeno); **: (1) translucência nucal elevada, (1) higroma cístico, (1) holoprosencefalia, (1) hidropsia; alterações cromossômicas entre parênteses; n: número de casos.

Fonte: do autor.

5.2 MARCADORES DE INSTABILIDADE GENÔMICA

A frequência de MN, no grupo de G, apresentou-se estatisticamente aumentada em relação ao grupo de MNG. Ao dividir o grupo de G por trimestre gestacional, observou-se que o aumento na

frequência de MN manteve a diferença estatística quando comparado o terceiro trimestre gestacional com o grupo de MNG. Não foi observada diferença estatística nos parâmetros NPB, NBUD, IDN e ITD do grupo de G em relação ao grupo de MNG. O mesmo foi observado ao dividir o grupo de G por trimestre gestacional. Ao dividir o grupo de G por trimestre gestacional e comparar os trimestres entre si, percebeu-se uma diminuição no ITD no terceiro trimestre em relação ao segundo trimestre gestacional (tabela 3).

Tabela 3- Marcadores de instabilidade genômica nos grupos estudados.

		MN (média± DP)	NPB (média± DP)	NBUD (média± DP)	IDN (média± DP)	ITD (média± DP)
Mulheres não gestantes		10,8 ± 4,4 [#] (n: 32)	1,6 ± 1,3 (n: 32)	3,2 ± 2,1 (n: 32)	1,6 ± 0,2 (n: 32)	3,5 ± 3,8 (n: 24)
Gestantes						
	2º tri	12,8 ± 6,0 (n: 25)	1,7 ± 1,4 (n: 25)	4,3 ± 2,9 (n: 25)	1,6 ± 0,3 (n: 25)	6,0 ± 4,4 (n: 22)
	3º tri	16,0 ± 5,2 [*] (n: 10)	3,1 ± 2,3 (n: 10)	4,2 ± 2,1 (n: 10)	1,4 ± 0,1 (n: 10)	2,2 ± 1,9 [*] (n: 6)
Gestantes com Malformação Fetal						
	2º tri	11,8 ± 6,5 (n: 22)	1,8 ± 1,4 (n: 22)	4,4 ± 2,8 (n: 22)	1,6 ± 0,3 (n: 22)	3,4 ± 2,7 (n: 22)
	3º tri	11,6 ± 5,0 (n: 10)	1,0 ± 1,3 ^a (n: 10)	4,0 ± 4,2 (n: 10)	1,6 ± 0,3 (n: 10)	5,0 ± 4,4 (n: 10)

MN: micronúcleos; NPB: pontes nucleoplasmáticas; NBUD: *buds* nucleares; IDN: índice de divisão nuclear; ITD: índice total de dano – técnica do cometa; DP: desvio padrão; *: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney U) (comparação entre segundo e terceiro trimestre do grupo de gestantes); #: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (teste t) (comparação entre o grupo de gestantes e o grupo de mulheres não gestantes); ^a: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney U) (comparações entre os terceiros trimestres gestacionais dos diferentes grupos); ^{*}: representa a diferença estatística com $p \leq 0,01$ (teste t) (comparação entre o terceiro trimestre gestacional do grupo de gestantes e mulheres não gestantes).
Fonte: do autor.

O grupo de GMF apresentou frequência de MN, NPB e NBUD, e IDN e ITD semelhantes ao grupo de G. Ao dividir o grupo de GMF e o grupo de G por trimestre gestacional e fazer a comparação das gestantes do segundo trimestre entre si e do terceiro trimestre entre si, o único

parâmetro que apresentou diferença estatística foi a frequência de NPBs, com diminuição no terceiro trimestre do grupo de GMF em relação ao terceiro trimestre do grupo de G.

5.3 CARIÓTIPO FETAL

A análise do cariótipo fetal foi realizada a partir das amostras de líquido amniótico coletadas. De acordo com o cariótipo obtido, a amostra foi dividida entre gestantes com fetos cromossomicamente normais (46,XX ou 46,XY) e cromossomicamente anormais (cariótipo alterado). Percebeu-se um aumento estatístico de NPB, NBUD, MPO, idade materna e diminuição de IDN nas gestantes com alteração no cariótipo fetal em relação às gestantes com cariótipo fetal normal. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para os parâmetros MN, ITD, TBARS e PC (tabela 4).

5.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS

A PC apresentou valores estatisticamente aumentados ao comparar o grupo de G com o grupo de MNG. O grupo de G foi dividido por trimestre gestacional e percebeu-se que as gestantes no terceiro trimestre de gestação apresentavam os maiores valores de PC, mantendo a diferença estatística em relação ao grupo de MNG. Os valores de TBARS do grupo de G foram semelhantes aos valores observados no grupo de MNG. Ao dividir o grupo de G por trimestre gestacional, percebeu-se que as gestantes que estavam no terceiro trimestre de gestação apresentaram os maiores valores. Dessa forma o terceiro trimestre do grupo de G foi comparado ao grupo das MNG, sendo observado um aumento, porém não estatístico ($p= 0,078$), nos valores de TBARS. Foram feitas comparações entre os diferentes trimestres gestacionais do grupo de G e percebeu-se um aumento estatístico de PC e também uma tendência de aumento ($p= 0,208$) de TBARS no terceiro trimestre gestacional (tabela 5).

Com relação às defesas antioxidantes, não foi observada diferença na atividade da enzima CAT entre os grupos de G e MNG. Porém, ao dividir o grupo de G por trimestre gestacional, percebeu-se um aumento de atividade da CAT no terceiro trimestre do grupo de G em relação às MNG. Também foi observada elevação na atividade da CAT do segundo para o terceiro trimestre de gestação do grupo de G.

O grupo de GMF apresentou valores semelhantes de PC, TBARS, CAT e MPO em relação ao grupo de G. Os grupos de gestantes foram

divididos por trimestre gestacional e foram feitas comparações entre as gestantes do grupo de G e do grupo de GMF que estavam no segundo trimestre, sendo o mesmo feito com as gestantes que estavam no terceiro trimestre gestacional. Percebeu-se que não houve diferença entre as gestantes de segundo trimestre para os marcadores PC, TBARS, CAT e MPO. Também não houve diferença estatística entre as gestantes de terceiro trimestre nos valores de TBARS e MPO, porém a PC e a CAT apresentaram uma diminuição estatística no terceiro trimestre do grupo de GMF em relação ao terceiro trimestre do grupo de G (tabela 5).

Tabela 4- Valores dos parâmetros avaliados em relação ao cariótipo fetal.

	47,X ₂ ,+21 (n: 4)	47,X ₂ ,+18 (n: 5)	ϑ (n: 1)	Δ (n: 1)	Total (cariótipo alterado) (n: 11)	46,X ₂ (n: 21)	Valor de p
MN (média±DP)	16,5±7,8	12,0±5,2	13,0	8,0	13,4±6,1 (n: 11)	10,2±5,4 (n: 21)	0,149
NPB (média±DP)	2,8±1,0	1,6±1,7	4,0	1,0	2,2±1,5* (n: 11)	1,0±1,1 (n: 21)	0,026
NBUD (média±DP)	5,5±3,1	4,6±4,9	8,0	6,0	5,4±3,7* (n: 11)	2,6±2,0 (n: 19)	0,035
IDN (média±DP)	1,4±0,2	1,4±0,3	1,2	1,6	1,4±0,2* (n: 10)	1,6±0,3 (n: 21)	0,049
ITD (média±DP)	3,2±2,6	5,0±3,9	3,0	3,0	4,0±3,0 (n: 11)	3,6±2,8 (n: 20)	0,749
MPO (mU.mL ⁻¹) (média±DP)	829,1±281,1	762,0±315,9	720,6	743,2	781,0±255,4* (n: 11)	599,0±113,5 (n: 20)	0,026
TBARS (nmol.mL ⁻¹) (média±DP)	24,0±9,3	25,2±5,6	3,24	24,61	22,7±9,0 (n: 11)	20,0±9,9 (n: 21)	0,452
PC (nmol.mg ⁻¹) (média±DP)	0,17±0,13	0,11±0,03	0,15	0,11	0,14±0,08 (n: 11)	0,12±0,04 (n: 20)	0,483
Idade (anos) (média±DP)	38,5±1,9	30,6±9,0	37	39	34,8±7,1* (n: 11)	27,9±6,7 (n: 21)	0,010

MN: micronúcleos; NPB: pontes nucleoplasmáticas; NBUD: *buds* nucleares; IDN: índice de divisão nuclear; ITD: índice total de dano – técnica do cometa; MPO: mieloperoxidase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC: proteína carbonilada; ϑ: 47,XY,+13(inv9)(p12q13); Δ: 46,XX,del(4)(p15); 47,X₂,+21: 47,XX,+21 ou 47,XY,+21; 47,X₂,+18: 47,XX,+18 ou 47,XY,+18; 46,X₂: 46,XX ou 46,XY (cariótipo normal); DP: desvio padrão; *: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney U ou teste t) (comparações entre os grupos cariótipo alterado e 46,X₂).

Fonte: do autor.

Tabela 5- Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e atividade da MPO

	TBARS (nmol.mL ⁻¹) (média±DP)	PC (nmol.mg ⁻¹) (média±DP)	CAT (mmol.min ⁻¹ . mL ⁻¹) (média±DP)	MPO (mU.mL ⁻¹) (média±DP)
Mulheres não gestantes	20,7±11,4 (n: 29)	0,10±0,02 [#] (n: 29)	557,6±277,5 (n:19)	661,9±272,1 (n: 33)
Gestantes				
2° tri	22,5±7,7 (n: 20)	0,11±0,04 (n: 18)	560,4±227,9 (n:16)	745,2±289,6 (n: 24)
3° tri	28,9±13,4 (n: 9)	0,19±0,04 ^{**■} (n: 10)	880,6±290,1 ^{*■} (n:6)	766,2±202,1 (n: 10)
Gestantes com malformação fetal				
2° tri	22,2±9,0 (n: 22)	0,13±0,04 (n: 20)	644,3±380,4 (n:20)	674,6±208,6 (n: 22)
3° tri	18,1±10,0 (n: 10)	0,10±0,02 ^{aa} (n:9)	518,4±284,2 ^a (n:10)	645,3±144,8 (n: 10)

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC: proteína carbonilada; CAT: catalase; MPO: mieloperoxidase; DP: desvio padrão; **: representa a diferença estatística com $p \leq 0,001$ (teste t) e *: representa a diferença estatística com $p \leq 0,01$ (Mann-Whitney U) (comparação entre o segundo e o terceiro trimestre do grupo de gestantes); #: representa a diferença estatística com $p \leq 0,01$ (teste t) (comparação entre mulheres não gestantes e gestantes); ^{aa}: representa a diferença estatística com $p \leq 0,001$ (teste t) e ^a: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney U) (comparação entre os terceiros trimestres gestacionais dos diferentes grupos); ■: representa a diferença estatística com $p \leq 0,001$ (teste t) e ■: representa a diferença estatística com $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney U) (comparação entre o terceiro trimestre do grupo de gestantes e mulheres não gestantes).

Fonte: do autor.

A partir das amostras de LA coletadas para a realização do cariótipo fetal, foram feitas dosagens de AFP. A tabela 6 demonstra os valores de referência de AFP no LA fornecidos pelo fabricante do kit diagnóstico, as medianas dos valores dosados e os valores calculados a partir da regressão \log_{10} destas medianas. Para realizar a regressão \log_{10} foram excluídos os “outliers” e as amostras acima de 32 semanas de gestação.

Com os valores da bula e os valores obtidos a partir da regressão em \log_{10} (tabela 6), foi calculado o múltiplo das medianas (MoM) de cada paciente: MoM (paciente) = resultado (paciente)/mediana (valor fornecido pelo fabricante ou valor obtido a partir da regressão \log_{10}). O gráfico da figura 14 demonstra os valores calculados a partir dessa fórmula.

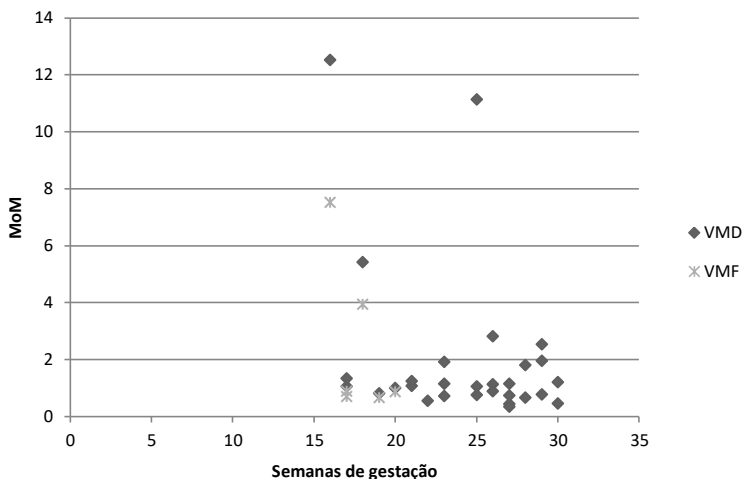
Tabela 6- Concentrações de AFP no LA de acordo com a idade gestacional.

Idade gestacional (semanas)	Valores da bula ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	No.	Mediana observada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Regressão (\log_{10}) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
16	14,3			
17	11,9	2	9,3	7,8
18	9,8			7,1
19	8,1	1	5,2	6,5
20	6,7	1	5,8	5,8
21		2	6,0	5,2
22		1	2,5	4,7
23		3	4,7	4,1
24				3,6
25		3	2,8	3,1
26		3	3,0	2,6
27		4	1,3	2,2
28		2	2,1	1,7
29		3	2,6	1,3
30		2	0,7	0,9

No.: número de amostras.

Fonte: do autor.

Figura 14- Gráfico de alfafetoproteína (MoM) versus idade gestacional.



MoM: múltiplo das medianas calculado a partir da AFP; VMD: valores de MoM a partir da regressão \log_{10} das medianas dosadas; VMF: valores de MoM a partir dos valores fornecidos pelo fabricante.

Fonte: do autor.

5.5 CORRELAÇÕES

Os dados quantitativos foram correlacionados utilizando o teste de correlação de Pearson ou Spearman de acordo com o tipo de distribuição da amostra. Observou-se forte correlação negativa (ρ : -0,789; $p < 0,0001$) entre a concentração de AFP nas amostras de líquido amniótico e a idade gestacional. Considerando a amostra completa, o índice total de dano (ITD) avaliado pela técnica do cometa também apresentou correlação negativa com a idade gestacional (tabela 7).

Considerando todas as amostras, a frequência de MN correlacionou positivamente com a idade, assim como o IDN. Observou-se correlação entre MN, NPB, NBUD e IDN. A PC correlacionou positivamente com MN, NBUD e IDN (tabela 7), porém ao testar a correlação por grupo, verificou-se que apenas o grupo de gestantes manteve a correlação de PC com MN (ρ : 0,430; p : 0,022), NBUD (ρ : 0,363; p : 0,035) e IDN (ρ : -0,508; p : 0,006). Também observou-se correlação entre PC e MPO. TBARS não correlacionou com nenhum parâmetro quantitativo.

5.6 HÁBITOS DE VIDA

Devido ao baixo consumo, pelas participantes do estudo, de alguns itens (vegetarianismo, refrigerante, chimarrão – *Ilex paraguayensis*, adoçante) respondidos no questionário (ANEXO I), testes estatísticos não foram aplicados. Com relação ao consumo de café, considerando a amostra completa, houve um aumento na frequência de NBUDs ($p = 0,03$), nas participantes que consomem café diariamente ($4,6 \pm 2,8$; $n = 65$) em comparação com as que não consomem café ou não tem este hábito diário ($2,8 \pm 2,2$; $n = 30$). As participantes do estudo com histórico de fumo, somadas a única participante que continuou fumando durante a gestação apresentaram um aumento na frequência de MN ($14,2 \pm 5,6$; $n = 21$) ($p = 0,02$) em relação às participantes que nunca fumaram ou fumaram por menos de um ano durante a vida ($11,4 \pm 4,8$; $n = 71$). A média de idade foi semelhante entre os grupos (histórico de fumo: $30,1 \pm 5,6$; sem histórico de fumo: $28,6 \pm 6,3$).

Tabela 7- Correlações entre parâmetros quantitativos considerando todas as participantes do estudo.

	IG	ID	MNs	NPB	NBUD	IDN	ITD	PC	MPO
IG	1,000	r 0,009	r 0,203	ρ -0,150	ρ -0,079	r -0,223	ρ -0,281*	ρ 0,192	r -0,024
ID		1,000	r 0,301**	ρ 0,166	ρ 0,176	r -0,214*	ρ -0,079	ρ 0,105	r 0,101
MNs			1,000	ρ 0,394**	ρ 0,504**	r -0,562**	ρ -0,093	ρ 0,260*	r 0,143
NPB				1,000	ρ 0,315**	ρ -0,298**	ρ 0,205	ρ 0,206	ρ -0,032
NBUD					1,000	ρ -0,402**	ρ 0,072	ρ 0,258*	ρ 0,100
IDN						1,000	ρ 0,089	ρ -0,290**	r -0,155
ITD							1,000	ρ -0,143	ρ -0,216
PC								1,000	ρ 0,239*
MPO									1,000

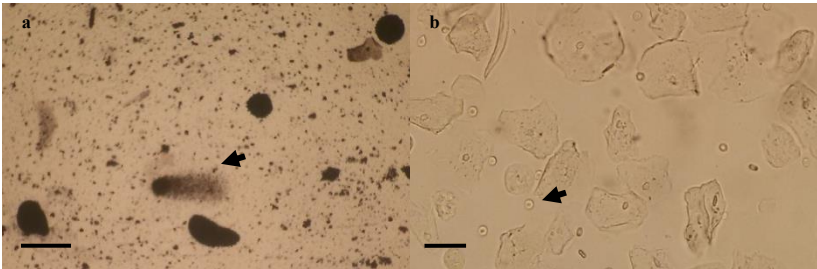
IG: idade gestacional; ID: idade em anos; MN: micronúcleos; NPB: pontes nucleoplasmáticas; NBUD: buds nucleares; IDN: índice de divisão nuclear; ITD: índice total de dano; PC: proteína carbonilada; MPO: mieloperoxidase; **: a correlação é significativa no nível 0,01; *: a correlação é significativa no nível 0,05; ρ : r \hat{o} de Spearman; r: coeficiente de correlação de Pearson.

Fonte: do autor.

5.7 VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DO COMETA EM AMNIÓCITOS DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

Para a realização desta técnica foram utilizadas as amostras de líquido amniótico recém coletadas, chamadas neste trabalho de amostras de líquido amniótico bruto (LAB) e algumas das células fetais após serem cultivadas para a técnica do cariótipo, que chamaremos de líquido amniótico pós-cultura (LAPC). No caso das amostras de LAB, o material foi centrifugado a 300 g por 6 min, retirado o sobrenadante e o pellet foi submetido à técnica do cometa conforme descrito nos métodos deste trabalho (figura 15a).

Figura 15- Amostras de líquido amniótico.



a: amostra de líquido amniótico bruto submetido à técnica do cometa, seta indica um amniócito com dano 3 (barra representa 20 μm); **b:** amostra de líquido amniótico bruto, seta indica a presença de hemácias (barra representa 30 μm).

Fonte: do autor.

Já as células do LAPC foram separadas em células eventualmente soltas da superfície da garrafa e células aderidas. As eventuais células soltas, mas sem indício de contaminação da cultura celular, foram retiradas da garrafa juntamente com o meio de cultura e colocadas em um tubo cônico. Foi adicionado 1 mL da solução tripsina (0,25%) / EDTA (0,03%) na garrafa de cultura e esta solução foi rapidamente retirada da garrafa e acrescentada no mesmo tubo cônico com o meio de cultura para inativar a tripsina. As células aderidas na superfície da garrafa foram colhidas através da adição de mais 1,0 mL da mesma solução de tripsina na garrafa de cultura, que desta vez permaneceu em contato com as células por aproximadamente 40 seg. Durante este curto período, a garrafa de cultura foi alternada entre a chapa aquecida (40°C) e microscópio invertido. Assim que foi observada a soltura das células, algumas que por ventura ainda ficaram aderidas, foram soltas com a

ajuda mecânica através de algumas batidas do frasco na bancada. A tripsina, juntamente com as células, foram colhidas com uma pipeta Pasteur e transferidas para um tubo cônico contendo 2 mL de RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB para inativar a tripsina. Os tubos cônicos contendo as células soltas e as que estavam aderidas foram centrifugados por 6 min a 300 g, o sobrenadante descartado e os *pellets* submetidos à técnica do cometa conforme descrito na metodologia.

Com relação à técnica realizada a partir do LAB, a presença de sangue materno (figura 15b) foi detectada em algumas destas amostras. Com isso foi feita a contagem de hemácias em câmara de Neubauer.

6 DISCUSSÃO

O DNA é constantemente exposto a danos e a maquinaria do reparo celular é capaz de reparar a maioria deles. Alguns danos inevitavelmente escapam ao reparo, levando, com o tempo, ao acúmulo de mutações, sendo que a probabilidade de acúmulo de instabilidade genética será maior quanto maior for a idade celular (AUNAN et al., 2016). Neste trabalho, considerando a amostra completa, foi observada correlação positiva da frequência de MN e correlação negativa do IDN com a idade. Diversos autores relataram o aumento da frequência de MN com a idade (BOLOGNESI et al., 1997; COPPEDE et al., 2007; FENECH E BONASSI, 2011), com diferentes fatores podendo contribuir para esta elevação, como aberrações cromossômicas numéricas e estruturais causadas por diferentes tipos de exposição (genotoxinas endógenas, nutrição inadequada e estilo de vida pouco saudável) e o efeito cumulativo de mutações adquiridas (genes envolvidos no reparo do DNA, segregação cromossômica e ponto de controle do ciclo celular). As mulheres tendem a ter a frequência de MN aumentada em relação aos homens. Até 72% dos MN observados nas mulheres são representados pelo cromossomo X, com 37% destes parecendo faltar o cinetócoro funcional, possivelmente pela inativação do cromossomo X (HANDO et al., 1994; FENECH e BONASSI, 2011; FENECH et al., 2011). O IDN avalia o estado proliferativo das células viáveis, e no caso dos linfócitos, é também uma medida da resposta mitogênica, sendo útil como biomarcador da função imune (FENECH, 2007). Ao longo dos anos, ocorre, dentre outras alterações, uma diminuição da atividade proliferativa de linfócitos T com consequente queda na resposta imune (AKBAR et al., 2016). A correlação do IDN com a idade, neste trabalho, está de acordo com as mudanças percebidas no sistema imune com o passar dos anos.

A frequência de MN apresentou-se elevada no grupo de gestantes em relação às mulheres, com média de idade semelhante entre os grupos. Diferentes autores (SHARMA e DAS, 1986; GHOSH e GHOSH, 1988) observaram um aumento na frequência de troca de cromátides irmãs (TCIs) nas gestantes em relação a mulheres não gestantes. As TCIs são trocas simétricas entre cromátides irmãs, que ocorrem naturalmente durante o processo de replicação do DNA. Estima-se que ocorram de 3 a 4 trocas por célula durante este processo, porém em determinadas situações a frequência destas trocas pode estar aumentada (WILSON e THOMPSON, 2007), sendo esse aumento um indicativo de instabilidade genômica. O aumento na frequência de MN

no grupo de gestantes não poderia ser atribuído a diferentes taxas de crescimento dos linfócitos no CBMN - citoma, já que o IDN permaneceu constante nos grupos avaliados. Uma possível explicação seria que ao final da gestação há uma mudança na proporção relativa das subclasses de linfócitos T (SCHOBER et al., 2012), podendo alguma delas apresentar uma alteração na frequência de troca entre cromátides irmãs espontâneas (SHARMA e DAS, 1986) ou na frequência de formação de MN. No estudo realizado por Sharma e Das (1986) a frequência aumentada de TCIs foi percebida ao comparar gestantes de terceiro trimestre com mulheres não gestantes. Neste trabalho, o aumento de MN também foi percebido principalmente no terceiro trimestre gestacional do grupo de gestantes.

Considerando a amostra completa, observou-se correlação positiva da proteína carbonilada (PC) com MN e NBUD, e correlação negativa com IDN (tabela 7). Ao avaliar a correlação destes parâmetros por grupo, o grupo de gestantes foi o único que manteve a correlação. Outros fatores devem ser levados em consideração em relação ao aumento da frequência de MN no grupo de gestantes. Este aumento, observado principalmente no terceiro trimestre, pode estar relacionado ao aumento de estresse oxidativo relatado neste período gestacional (CARONE et al., 1993; PATIL et al., 2007). Somado a isto, outros fatores ainda não conhecidos podem ter levado ao aumento da frequência de MN. Fenech (2011), ao revisar a literatura, relatou que o aumento anormal na frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico foi associado a complicações na gestação como aborto, pré-eclampsia e CIUR, porém o próprio autor observa que a associação da expressão de MN com infertilidade e complicações da gravidez estão apenas no início.

Observou-se correlação positiva entre os parâmetros MN, NBUDs e NPB, e correlação negativa de todos com o IDN (tabela 7). Apesar da formação destas anomalias nucleares (MN, NBUDs e NPB) ocorrer através de diferentes mecanismos moleculares, todos são considerados biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica (FENECH, 2007). Houve correlação positiva entre PC e MPO. A dosagem de PC determina o conteúdo carbonil em proteínas oxidativamente modificadas (BURTON e JAUNIAUX, 2011) e a MPO tem um papel importante nas reações inflamatórias (SOUBHYE et al., 2016). Neutrófilos e monócitos ativados sintetizam e secretam MPO, que uma vez na circulação, pode ser sequestrada pelo espaço subendotelial e se acumular na matriz celular. Com isso, a MPO pode ser uma fonte de EROS e ERNs, e consumo de antioxidantes, levando

ao estresse oxidativo (HUNG et al., 2012). Além disso, os grupos carbonil podem ser gerados nas proteínas por reação direta do ácido hipocloroso (WILKIE-GRANTHAM et al., 2015).

O aumento das demandas metabólicas do feto em crescimento leva ao aumento do estresse fisiológico e metabólico materno (BUKHARI et al., 2011). Toescu e colaboradores (2002) relataram que mudanças acentuadas no metabolismo lipídico de gestantes (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia com preponderância das subfrações de LDL pequenas e densas) correlacionaram com aumento de hidroperóxido lipídico à medida que a gestação avança. Esta hiperlipidemia, característica no período gestacional tardio, é associada à elevação do estresse oxidativo (BUKHARI et al., 2011). Neste estudo, comparações dos parâmetros que avaliam o estresse oxidativo no grupo de gestantes demonstraram um aumento significativo da PC ($p < 0,001$) e uma tendência de aumento de TBARS ($p = 0,208$) do segundo para o terceiro trimestre. O aumento de produtos de lipoperoxidação do segundo para o terceiro trimestre gestacional foi relatado por diferentes autores (CARONE et al., 1993; PATIL et al., 2007; ATIBA et al., 2014). Também houve um aumento significativo dos produtos de oxidação proteica ($p \leq 0,001$) e um aumento dos produtos de lipoperoxidação, porém não estatístico ($p = 0,078$), no terceiro trimestre das gestantes em comparação às mulheres não gestantes, em concordância com o observado por outros autores (MORRIS et al., 1998; ZUSTERZEEL et al., 2000).

Há diferentes relatos relacionados à atividade da CAT na gestação normal. Foram observados valores aumentados nos três trimestres de gestação em relação a mulheres não gestantes (ADEMUYIWA et al., 2007), com valores constantes (CARONE et al., 1993) nos três trimestres gestacionais, ou diminuição do segundo para o terceiro trimestre gestacional (PATIL et al., 2007). Neste trabalho, percebeu-se um aumento na atividade da CAT do segundo para o terceiro trimestre gestacional do grupo de gestantes, assim como um aumento no terceiro trimestre de gestação em relação às mulheres não gestantes.

Com relação aos diferentes trimestres gestacionais do grupo de gestantes com malformação fetal, percebeu-se que as gestantes do segundo trimestre apresentaram valores semelhantes às gestantes de segundo trimestre do grupo de gestantes para os marcadores testados. No entanto, as gestantes com malformação fetal no terceiro trimestre, apresentaram uma diminuição nos parâmetros PC, NPB e CAT em relação às gestantes no mesmo período gestacional. Peter Stein e

colaboradores (2008) observaram uma excreção urinária inferior de 8-OHdG em mães de fetos com defeitos congênitos em relação aos outros participantes do estudo. O autor relata que este é o oposto do que se esperava de um modelo simples de estresse oxidativo, em que o aumento da oxidação do DNA leva ao dano fetal. Em nosso estudo, seis dos fetos das gestantes do grupo de gestantes com malformação fetal no terceiro trimestre gestacional apresentavam algum tipo de malformação cardíaca, sem alteração de cariótipo. Zhang e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do alelo ALDH2*2 na cardioproteção de pacientes com malformação cardíaca congênita. O estudo associou os portadores deste alelo com malformação cardíaca congênita cianótica a um fenótipo de remodelação metabólica induzida e um pool de GSH compensatório no miocárdio. Gestante e feto estão intimamente conectados, sendo inclusive observadas fortes correlações positivas entre os marcadores de estresse oxidativo (MDA) no plasma materno e no cordão umbilical de fetos de 24 a 28 semanas (LUO et al., 2015). Neste trabalho, os fetos com malformação cardíaca congênita e as mães poderiam apresentar algum genótipo que induza uma remodelação metabólica e leve a este resultado diferenciado das gestantes de terceiro trimestre do grupo de gestantes. Deve-se também ser levado em consideração que o diagnóstico da malformação fetal feito anteriormente na gestação, pode ter levado a mudanças em alguns hábitos [ex. uso de vitaminas (FURNESS et al., 2013), hábitos de vida saudáveis (FURNESS et al., 2011)] na tentativa de evitar maiores danos ao feto.

Peitryga e colaboradores (2017) correlacionaram baixas dosagens de GSH com o risco de aberrações cromossômicas e malformações congênitas em fetos de gestantes testadas no fim do primeiro trimestre gestacional. O primeiro trimestre, principalmente até a oitava semana, é o período mais crítico para o desenvolvimento de malformações fetais. Estudos em modelos animais de embriopatia diabética relacionaram o aumento do estresse oxidativo induzido por hiperglicemia, nas fases iniciais da gestação, ao aumento na frequência de malformações fetais em gestantes diabéticas (LOEKEN, 2004). Estudos em humanos em fases tão iniciais da gestação são dificultados muitas vezes pela falta de conhecimento do estado gestacional, entre outros fatores (CLAPES et al., 2013).

As malformações congênitas são importantes causas de mortalidade infantil, doenças crônicas e incapacitantes, sendo o resultado da combinação de diferentes fatores. Um dos fatores que leva às malformações fetais são as anormalidades cromossômicas fetais

(WHO, 2018), sendo neste trabalho investigadas através da análise do cariótipo fetal a partir da coleta de líquido amniótico. O grupo das gestantes com fetos cromossomicamente anormais apresentou média de idade superior, aumento na atividade de MPO, frequência de NBUDs, frequência de NPB e diminuição do IDN em relação às gestantes com fetos cromossomicamente normais. Com o avanço da idade materna há um aumento na probabilidade de aneuploidia (HASSOLD e HUNT, 2009). Hassold e Hunt (2009) ao revisarem a literatura, relataram que provavelmente existam múltiplas causas de não-disjunção relacionadas ao aumento da idade materna e gestações cromossomicamente anormais. Foi inclusive sugerido que cromossomos diferentes possuem rotas diferentes para a não-disjunção dependente e independente da idade. A síndrome de Down é a anormalidade cromossômica mais frequente, sendo assim a mais estudada. Especificamente com relação a esta síndrome, a análise de células de ovário fetal demonstrou altas quantidades deste mosaicismo, relacionando o atraso no desenvolvimento dos oócitos com trissomia do cromossomo 21, com o retardo na ovulação destes oócitos em comparação aos oócitos normais. A explicação seria então que o grupo de folículos em crescimento que contém um oócito trissômico aumenta com a idade, e não porque a incidência de não-disjunção do cromossomo 21 aumenta nos oócitos normais.

Em outra abordagem, foi relatado o aumento na frequência de MN em pais (considerando o casal) (SILVA-GRECCO et al., 2012) e mães (COPPEDE et al., 2007) de crianças com SD, indicando que mães de indivíduos com SD são mais propensas a danos cromossômicos e eventos de mal-segregação em linfócitos periféricos (COPPEDE et al., 2007). Ao analisarmos separadamente cada um dos cariótipos obtidos, observamos que as gestantes com fetos portadores de SD (tabela 4) apresentavam uma frequência elevada de MN em relação às outras síndromes. No entanto, a frequência de MN correlacionou positivamente com a idade e a média de idade destas gestantes foi superior à média encontrada nas gestantes com cariótipo normal. Coppede e colaboradores (2010) estudaram mães com menos de 35 anos com filhos com síndrome de Down e sugeriram uma ligação entre polimorfismos em genes metabólicos do folato e risco para SD, através da relação da frequência de MN com diferentes genótipos de genes metabólicos do folato (MTHFR 677TT, RFC1 80AA, TYMS 1494 6bp +/-, TYMS 28bp 3R/3R e MTR 2756AA). Os autores sugerem conexões biológicas complexas entre as variáveis estudadas e as duas condições (ser mãe de indivíduos com SD ou mãe controle). Ainda, o

mesmo autor, em trabalho recentemente publicado (COPPEDE et al., 2016), sugere que as epimutações na metilenoetrahidrofolato redutase (MTHFR) (gene da via do folato) provavelmente contribuem para o aumento da instabilidade genômica observada em células de mães de indivíduos com SD, podendo desempenhar um papel no risco de nascimento de criança com SD. Neste trabalho, NBUDs e NPB apresentaram valores aparentemente elevados em relação às gestantes com cariótipo normal, concordando com os achados de aumento da instabilidade genômica em mães de indivíduos com SD. O aumento de MPO em gestantes de fetos com SD, verificado neste trabalho, concorda com os trabalhos que sugerem a presença de possíveis mecanismos inflamatórios em gestantes com fetos com SD (PINTO et al., 2015; ZBUCKA-KRETOWSKA et al., 2017).

A presença de malformações fetais pode ser sugerida através da pesquisa de marcadores bioquímicos no sangue materno. A dosagem de AFP está bem estabelecida como preditiva de complicações da gravidez. Inclusive, um artigo publicado recentemente (SHARONY et al., 2016) sugere que a relação entre a AFP dosada no plasma e no LA pode servir como um preditor de CIUR e número de semanas para o parto. A AFP dosada no LA pode ser utilizada de forma complementar à ultrassonografia morfológica para melhorar o diagnóstico de anormalidades fetais (FLICK et al., 2014). A AFP atinge a máxima concentração no LA ao final do primeiro trimestre, declinando exponencialmente entre 14 e 32 semanas de gestação (WYSZYNSKI, 2005). Neste trabalho, as amostras de LA foram coletadas entre 16 e 33 semanas de gestação, sendo a correlação fortemente negativa da AFP com a idade gestacional (tabela 7) esperada para essa faixa de IG. Uma vez que as concentrações de AFP apresentam valores muito diferentes de acordo com a IG, os valores são expressos usualmente como múltiplos da mediana (MoM), permitindo a comparação dos valores de AFP nas diferentes idades gestacionais (WALD et al., 1977).

Foram utilizados os valores de referencia fornecidos pelo fabricante do kit para comparação dos dados. No entanto, o fabricante fornece valores de referencia apenas entre 15 e 20 semanas de gestação. Desta forma, foi feita uma regressão em \log_{10} , com as amostras coletadas neste trabalho, para permitir a comparação entre elas. Os valores desta curva ficaram próximos, mas inferiores aos valores de referencia da bula. A curva foi construída com um reduzido número de amostras e com amostras de gestações anormais, sendo esperada certa variação em relação aos dados fornecidos pelo fabricante. Como as amostras foram coletadas até 33 semanas de gestação e a queda

exponencial da AFP no LA é observada até 32 semanas, as amostras que ficaram acima de 32 semanas não foram incluídas nesta análise.

Na literatura, valores acima de 2,5 MoM no LA foram relacionadas a defeitos no fechamento do tubo neural (NTD) (LEGUY et al., 2011). Neste trabalho, foram analisadas as concentrações exacerbadas (acima de 2,5 MoM) de AFP no LA caso a caso, entendendo as possíveis causas da elevação. As amostras coletadas em idade gestacional superior a 20 semanas foram comparadas com a curva calculada a partir da regressão de \log_{10} (tabela 6). Como os valores desta curva ficaram mais baixos que os valores fornecidos pelo fabricante, apenas os valores acima de 3,0 MoM foram analisados.

A amostra de LA com valor de 12,5 MoM utilizando a comparação com as outras amostras (VMD) ou 7,5 MoM utilizando os valores fornecidos pelo fabricante (VMF) (figura 14) foi de um feto com encefalocele (um tipo de malformação relacionada ao fechamento inadequado do tubo neural). Nos fetos com defeito no fechamento do tubo neural, a AFP passa diretamente para o líquido amniótico causando níveis expressivamente altos de AFP (WYSZYNSKI, 2005). Valores de até 9,3 MoM foram encontrados em fetos com NTD por Leguy e colaboradores (2011). Outras duas amostras com valores 5,4 MoM (VMD) ou 3,9 MoM (VMF) e 11,1 MoM (VMD) foram de fetos com onfalocele (malformação na parede abdominal). Palomaki e colaboradores (1988) observaram mediana de 4,1 MoM (0,5 a 29,8) de AFP nesse tipo de malformação fetal. A onfalocele é um defeito da parede abdominal média com a extrusão de vísceras abdominais, coberto por um saco membranoso, com isso, ocorre, com maior facilidade, a passagem de proteínas plasmáticas fetais para o LA (STOLL et al., 2008).

Além das diferentes alterações bioquímicas relatadas em gestantes, alterações hormonais também são observadas. Neste trabalho, houve correlação negativa entre a IG e o índice de dano total obtido através da técnica do cometa. Os níveis de progesterona e 17β -estradiol aumentaram progressivamente ao longo da gestação (OLUWATAYO et al., 2016). A concentração sérica de 17β -estradiol, um antioxidante natural que pode desempenhar um papel protetor durante a gravidez, pode afetar os níveis de dano ao DNA, conforme demonstrado por Kalembe-Drozdz (2015). O autor encontrou correlação negativa entre a concentração de 17β -estradiol e o nível de pirimidinas e purinas oxidadas, bem como com os sítios alcali-lábeis.

Com relação aos hábitos de vida obtidos através do questionário, considerando a amostra completa, as participantes que tinham o hábito

de ingerir café diariamente apresentaram aumento na frequência de NBUDs em relação às que não tomavam café ou que não tinham este hábito diário. Na literatura, os relatos dos possíveis efeitos do consumo de café não são conclusivos, inclusive sendo em grande parte discordantes (SMITH et al., 1990; BARALE et al., 1998; KIEFER e WIEBEL, 1998; DAMIANI et al., 2017; LADEIRA et al., 2017). Os NBUDs são o resultado da amplificação do DNA, que é eliminada através de brotação nuclear (FENECH, 2007). O café pode causar amplificação de genes relacionados à intoxicação celular, expressando NBUDs. Considerando a amostra completa, as participantes que fumam ou fumaram por mais de um ano apresentaram aumento na frequência de MN em relação às participantes que nunca fumaram ou fumaram por menos de um ano durante a vida. Nefic e Handzic (2013) encontraram correlação positiva entre a frequência de MN e os anos de fumo. Sugere-se que os linfócitos de fumantes cometem mais erros no reparo do dano ao DNA do que as células de não fumantes (AU et al., 1991).

Com relação à validação da técnica do cometa em amostras de líquido amniótico, percebeu-se que nas situações de contaminação da amostra com sangue materno (figura 15b), a técnica fica prejudicada. Uma vez que o líquido amniótico apresenta baixa celularidade, uma pequena contaminação com sangue materno pode levar a uma falsa avaliação de dano dos leucócitos maternos em vez de amniócitos fetais. Para garantir que uma quantidade insignificante de sangue materno esteja presente no líquido amniótico, a amostra poderia ser submetida a uma contagem de hemácias em câmara de Neubauer. Assim, ao se detectar concentrações de até 1000 hm.mL^{-1} (ABDEL-RAZEQ et al., 2010) seria seguro prosseguir com a análise da amostra. A sugestão de contagem de hemácias é pela facilidade na identificação deste tipo celular em microscópio óptico, pois pode não ser tão fácil fazer a distinção entre os leucócitos e amniócitos.

Quanto ao LAPC, a técnica do cometa foi realizada nas eventuais células soltas de forma separada das células aderidas. A técnica realizada com as células soltas demonstrou a predominância de dano 4. Já a técnica feita com as células aderidas das mesmas amostras apresentaram danos variados. Isto sugere que estas células soltas provavelmente estavam em processo de morte celular. As células aderidas apresentaram danos variados provavelmente condizendo mais com o dano das células fetais em cultura. Neste caso, as células já passaram por várias divisões celulares e o dano avaliado pode estar sendo influenciado pelas condições da cultura celular, além da influência *in vivo* da vida intrauterina fetal.

7 CONCLUSÃO

A gestação é um processo fisiológico que pode levar a alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e nos marcadores de instabilidade genômica durante a evolução em comparação com mulheres não gestantes.

Considerando o segundo trimestre de gestação, não houve diferença nos parâmetros analisados entre o grupo de gestantes com malformação fetal e o grupo de gestantes. Já, com relação às gestantes no terceiro trimestre gestacional, o grupo de gestantes com malformação fetal apresentou uma redução de PC, CAT e NPB em comparação com o mesmo período gestacional do grupo de gestantes.

As gestantes com fetos com cariótipo alterado apresentaram aumento NBUD, NPB, MPO e idade, e diminuição do índice de divisão nuclear (IDN) em comparação às gestantes com fetos com cariótipo normal. Essas alterações foram induzidas principalmente por gestantes com fetos com síndrome de Down.

Considerando a amostra completa, as participantes que costumavam tomar café diariamente apresentaram frequência de NBUD aumentada em comparação com aqueles que não bebiam café ou não possuíam esse hábito diário, evidenciando uma resposta celular por amplificação de genes ligados à intoxicação.

Com relação à técnica do cometa em amniócitos é possível realizar a técnica tanto nas células antes da cultura, quanto nas células após a cultura celular, tomando os devidos cuidados.

Os resultados do presente estudo valem para os períodos gestacionais estudados, não sendo possível concluir sobre a possível alteração destes marcadores em outros períodos do desenvolvimento fetal.

Sendo assim, a alteração em alguns marcadores avaliados neste trabalho, sugere o aumento de estresse oxidativo e instabilidade genômica no grupo de gestantes, principalmente no terceiro trimestre gestacional. A alteração de parâmetros, observada nas gestantes com fetos com cariótipo alterado, sugere maior instabilidade genômica nessas gestantes. Como foi necessário dividir a amostra em grupos menores para compreender melhor os dados, são necessários outros estudos abrangendo um maior número de casos de cada uma das diferentes situações abordadas neste trabalho, para permitir uma melhor compreensão dos fatores envolvidos em cada situação.

Com isso, sugere-se a realização de futuros estudos relacionando alterações em marcadores de estresse oxidativo e instabilidade

genômica, observados principalmente no terceiro trimestre gestacional nesse trabalho, às diferentes características clínicas do parto, com o intuito de melhor compreender a influência desses parâmetros na gestação. Sugere-se ainda a realização de estudos com maior número de casos do mesmo tipo de malformação fetal, com alteração de cariótipo ou não, em relação à instabilidade genômica e estresse oxidativo, e em conjunto com a pesquisa de diferentes genótipos, permitindo entender separadamente os fatores envolvidos em cada uma delas. Estudos utilizando a técnica do cometa para avaliar o índice de dano ao DNA em amniócitos antes e após a cultura celular, nos diferentes tipos de malformação fetal e em relação à idade gestacional, poderiam ser realizados para verificar as influências do dano de DNA nas diferentes condições fetais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEQ, S. S. et al. Interpretation of amniotic fluid white blood cell count in "bloody tap" amniocenteses in women with symptoms of preterm labor. **Obstet Gynecol**, v. 116, n. 2, p. 344-354, Aug. 2010.
- ADEMUYIWA, O. et al. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 86, n. 10, p. 1175-1182, Oct. 2007.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, Jan. 1984.
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, n. 49, p. 1-31, Jun. 2012.
- AKBAR, A. N.; HENSON, S. M.; LANNA, A. Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 12, p. 866-876, Dez. 2016.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, Oct. 2010.
- ATIBA, A. S. et al. Malondialdehyde and antioxidant enzymes in second and third trimesters of pre-eclamptic Nigerian women. **Niger Postgrad Med J**, v. 21, n. 2, p. 150-154, Jun. 2014.
- AU, W. W. et al. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. **Mutat Res**, v. 260, n. 2, p. 137-144, Jun. 1991.
- AUNAN, J. R. et al. Molecular and biological hallmarks of ageing. **Br J Surg**, v. 103, n. 2, p. 29-46, Jan. 2016.
- AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde

and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 1-31, Jul. 2014.

AYE, I. L. M. H.; KEELAN, J. A. Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 2, p. 456-466, Apr. 2013.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**/ Barbara J. Bain; tradução Renato Failace. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 487 p.

BAKKER, M.; PAJKRT, E.; BILARDO, C. M. Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: what next? **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 28, n. 3, p. 355-366, Apr. 2014.

BARALE, R. et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. **Environ Mol Mutagen**, v. 31, n. 3, p. 228-242, Mai. 1998.

BHATTACHARJEE, S.; NANDI, S. Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer. **Clin Transl Med**, v. 5, n. 1, p. 1-6, Dec. 2016.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan. 2012.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, Jan. 1984.

BOLOGNESI, C. et al. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 6, n. 4, p. 249-256, Apr. 1997.

BOSSOLASCO, P. et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Res**, v. 16, n. 4, p. 329-336, Apr. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil 2015/2016: Uma análise da situação de saúde e da**

epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 386 p.

BUKHARI, S. A. et al. Oxidative stress elevated DNA damage and homocysteine level in normal pregnant women in a segment of Pakistani population. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 4, p. 2703-2710, Apr. 2011.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 370, n. 1663, p. 1-8, Mar. 2015.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 3, p. 287-299, Jun. 2011.

BUSS, I. H.; DARLOW, B. A.; WINTERBOURN, C. C. Elevated Protein Carbonyls and Lipid Peroxidation Products Correlating with Myeloperoxidase in Tracheal Aspirates from Premature Infants. **Pediatric Research**, v. 47, p. 640, Jan. 2000.

CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 619, Ago. 2008.

CARONE, D. et al. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 51, n. 2, p. 103-109, Oct. 1993.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat Res**, v. 204, n. 3, p. 379-406, Mar. 1988.

CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. Iron and oxidative stress in pregnancy. **J Nutr**, v. 133, n. 5, p. 1700-1708, May. 2003.

CASTAGNO, R. et al. Fetal Pleural Effusion. **Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 1, n. 1, p. 28-39, Mar. 2007.

CEREDA, A.; CAREY, J. C. The trisomy 18 syndrome. **Orphanet J Rare Dis**, v. 7, p. 1-14, Oct. 2012.

CLAPES, S.; FERNANDEZ, T.; SUAREZ, G. Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. **MEDICC Rev**, v. 15, n. 1, p. 37-40, Jan. 2013.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, May. 2008.

COPPEDE, F. et al. Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. **Am J Med Genet A**, v. 143a, n. 17, p. 2006-2015, Sep. 2007.

COPPEDE, F. et al. Increased MTHFR promoter methylation in mothers of Down syndrome individuals. **Mutat Res**, v. 787, p. 1-6, May. 2016.

COPPEDE, F. et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. **BMC Med Genomics**, v. 3, p. 1-10, Sep. 2010.

DAMIANI, A. P. et al. A reduction in DNA damage in neural tissue and peripheral blood of old mice treated with caffeine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 13-15, p. 621-629, Aug. 2017.

DASHE, J. S. et al. Hydramnios: anomaly prevalence and sonographic detection. **Obstet Gynecol**, v. 100, n. 1, p. 134-139, Jul. 2002.

DENNERY, P. A. Oxidative stress in development: nature or nurture? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 7, p. 1147-1151, Oct. 2010.

DREHMER, M. et al. Association of Second and Third Trimester Weight Gain in Pregnancy with Maternal and Fetal Outcomes. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-8, Jan. 2013.

DUHIG, K.; CHAPPELL, L. C.; SHENNAN, A. H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. **Obstet Med**, v. 9, n. 3, p. 113-116, Sep. 2016.

FELDT-RASMUSSEN, U.; MATHIESEN, E. R. Endocrine disorders in pregnancy: physiological and hormonal aspects of pregnancy. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 25, n. 6, p. 875-884, Dec. 2011.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. **Nat Protoc**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, Jun. 2007.

_____. Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 63-67, Jan. 2011.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 43-49, Jan. 2011.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, Jan. 2011.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res**, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, Feb-Apr. 1985.

FIALOVA, L. et al. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 66, n. 2, p. 121-127, Mar. 2006.

FINTELMAN-RODRIGUES, N. et al. Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC Polymorphisms as Maternal Risk Factors for Down Syndrome. **Dis Markers**, v. 26, n. 4, p. 155-161, 2009.

FLICK, A. et al. Routine measurement of amniotic fluid alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase: the need for a reevaluation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211, n. 2, p. 1-6, Aug. 2014.

FURNESS, D. et al. Folate, vitamin B12, vitamin B6 and homocysteine: impact on pregnancy outcome. **Matern Child Nutr**, v. 9, n. 2, p. 155-166, Apr. 2013.

FURNESS, D. L.; DEKKER, G. A.; ROBERTS, C. T. DNA damage and health in pregnancy. **J Reprod Immunol**, v. 89, n. 2, p. 153-162, May. 2011.

GHOSH, R.; GHOSH, P. K. Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of control women, pregnant women, and women taking oral contraceptives: Effects of cell culture temperature. **Environmental Mutagenesis**, v. 12, n. 2, p. 179-183, 1988.

GONÇALVES, L. F.; ROJAS, M. V. M.; VALERO, G. Spina bifida. 2017. Disponível em: < <https://sonoworld.com/Fetus/page.aspx?id=135> >. Acesso em: 10 maio 2017.

GUS, R. Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: MALUF, S. (Ed.). **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap. 5, p.54 - 62.

HALLIWELL, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: PRESS, O. U. (Ed.). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford, 2007. cap. 5, p.187-267.

HANDO, J. C.; NATH, J.; TUCKER, J. D. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. **Chromosoma**, v. 103, n. 3, p. 186-192, Jun. 1994.

HASSOLD, T.; HUNT, P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. **Curr Opin Pediatr**, v. 21, n. 6, p. 703-708, Dec. 2009.

HATTORI, Y. et al. Catalytic ferrous iron in amniotic fluid as a predictive marker of human maternal-fetal disorders. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, n. 1, p. 57-63, Jan. 2015.

HIXSON, L. et al. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. **J Lab Autom**, v. 20, n. 5, p. 562-573, Oct. 2015.

HUNG, T. H. et al. Myeloperoxidase in the plasma and placenta of normal pregnant women and women with pregnancies complicated by

preeclampsia and intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 33, n. 4, p. 294-303, Jan. 2012.

HUNG, T. H. et al. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. **Reprod Sci**, v. 17, n. 4, p. 401-409, Apr. 2010.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, Oct. 2009.

JOÓ, J. G. et al. Neural tube defects in the sample of genetic counselling. **Prenatal Diagnosis**, v. 27, n. 10, p. 912-921, Jun. 2007.

KALEMBA-DROZDZ, M. The interaction between air pollution and diet does not influence the DNA damage in lymphocytes of pregnant women. **Environ Res**, v. 136, p. 295-299, Jan. 2015.

KIEFER, F.; WIEBEL, F. J. Caffeine potentiates the formation of micronuclei caused by environmental chemical carcinogens in V79 Chinese hamster cells. **Toxicol Lett**, v. 96-97, p. 131-6, Aug. 1998.

KIM, S. et al. Mechanisms of germ line genome instability. **Semin Cell Dev Biol**, v. 54, p. 177-187, Jun. 2016.

LADEIRA, C. et al. Role of Macronutrients and Micronutrients in DNA Damage: Results From a Food Frequency Questionnaire. **Nutr Metab Insights**, v. 10, p. 1-8, Fev. 2017.

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, Suppl. 1, p. S61-S88, Jun. 2015.

LEGUY, M. C. et al. [Assessment of AFP in amniotic fluid: comparison of three automated techniques]. **Ann Biol Clin (Paris)**, v. 69, n. 4, p. 441-446, Jul./Aug. 2011.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, Jan. 1990.

LEINART, E.; JEANTY, P. Abdominal wall defects, Part I: Online Continuing Medical Education. 2017. Disponível em: <

<https://sonoworld.com/TheFetus/page.aspx?id=3052> >. Acesso em: 10 maio 2017.

LOEKEN, M. R. Free radicals and birth defects. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 15, n. 1, p. 6-14, Jan. 2004.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

LUO, Z.-C. et al. Perinatal Oxidative Stress May Affect Fetal Ghrelin Levels in Humans. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-7, Jun. 2015.

MAESTRI, D. et al. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. **Rev Ass Med Brasil** v. 44, n. 4, p. 273-276, Oct./Dec. 1998.

MIRANDA, J. A.; MATTEVI, M. S. Técnicas de bandeamento e coloração cromossômica. In: MALUF, S. (Ed.). **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap. 6, p.63-69.

MIRZA, B. et al. Cystic hygroma: an overview. **J Cutan Aesthet Surg**, v. 3, n. 3, p. 139-144, Sep. 2010.

MOORE, K. L. **Embriologia clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 524 p.

MORRIS, J. M. et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 105, n. 11, p. 1195-1199, Nov. 1998.

MUKHOPADHYAY, B. et al. Free radicals and antioxidants status in neonates with congenital malformation. **J Indian Assoc Pediatr Surg**, v. 20, n. 4, p. 179-183, Oct./Dec. 2015.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, Sep. 2001.

NEFIC, H.; HANDZIC, I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. **Mutat Res**, v. 753, n. 1, p. 1-11, Apr. 2013.

NEURAL tube defect. 2017. Disponível em: <
https://en.wikipedia.org/wiki/Neural_tube_defect >. Acesso em: 10
 maio 2017.

NEWBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control
 of maternal metabolism and fetal growth. **Curr Opin Endocrinol
 Diabetes Obes**, v. 18, n. 6, p. 409-416, Dec. 2011.

NIH. National Institute of Health. U. S. National Library of Medicine.
 Genetics Home Reference. Down syndrome. 2018a. Disponível em: <
<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/down-syndrome#statistics> >. Acesso
 em: 15 jan. 2018.

_____. National Institute of Health. U. S. National Library of
 Medicine. Genetics Home Reference. Trisomy 13. 2018b. Disponível
 em: < <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/trisomy-13#statistics> >. Acesso
 em: 15 jan. 2018.

_____. National Institute of Health. U. S. National Library of
 Medicine. Genetics Home Reference. Turner syndrome. 2018c.
 Disponível em: < <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/turner-syndrome> >.
 Acesso em: 15 jan. 2018.

OLUWATAYO, B. O. et al. Progesterone and 17 β -Estradiol Levels
 during Normal Pregnancy and the Puerperium among Women Attending
 a Tertiary Health Facility Clinic in Jos, Plateau State, Nigeria.
International Blood Research & Reviews, v. 5, n. 1, p. 1-7, Aug.
 2016.

OB-GYN, C. Basic OB Ultrasound. 2018. Disponível em: <
[http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_co
 ntent&view=article&id=160:basic-ob-us&catid=38&Itemid=378](http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=160:basic-ob-us&catid=38&Itemid=378) >.
 Acesso em: 16 fev. 2018.

OPAS/OMS. Organização Pan-americana da Saúde/ Organização
 Mundial da Saúde. OPAS/OMS insta países das Américas a reforçar
 vigilância de microcefalia e outras anomalias congênitas. 2017.
 Disponível em: <
[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article
 &id=5012:opasoms-insta-paises-das-americas-a-reforcar-a-vigilancia-](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5012:opasoms-insta-paises-das-americas-a-reforcar-a-vigilancia-)

dos-defeitos-de-nascimento-incluindo-microcefalia&Itemid=816 >. Acesso em: 15 nov. 2017

ORNOY, A. et al. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 105, n. 1, p. 53-72, Mar. 2015.

PALM, M. et al. Involvement of inflammation in normal pregnancy. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 92, n. 5, p. 601-605, May. 2013.

PALOMAKI, G. E. et al. Second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels in pregnancies associated with gastroschisis and omphalocele. **Obstet Gynecol**, v. 71, n. 6 Pt 1, p. 906-909, Jun. 1988.

PATIL, S. B.; KODLIWADMATH, M. V.; KODLIWADMATH, S. M. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. **Indian J Clin Biochem**, v. 22, n. 1, p. 135-137, Mar. 2007.

PETER STEIN, T. et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. **Free Radical Research**, v. 42, n. 10, p. 841-848, Jan. 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, India, v. 30, n. 1, p. 11-26, Mai. 2015.

PIETRYGA, M. et al. Selected oxidative stress biomarkers in antenatal diagnosis as 11-14 gestational weeks. **Free Radic Biol Med**, v. 108, p. 517-523, Apr. 2017.

PINTO, J. et al. Impact of fetal chromosomal disorders on maternal blood metabolome: toward new biomarkers? **Am J Obstet Gynecol**, v. 213, n. 6, p. 841.e1-841.e15, Dec. 2015.

RAJIAH, P. et al. Ultrasound of fetal cardiac anomalies. **AJR Am J Roentgenol**, v. 197, n. 4, p. W747-W760, Oct. 2011.

RAO, R.; PLATT, L. D. Ultrasound screening: Status of markers and efficacy of screening for structural abnormalities. **Semin Perinatol**, v. 40, n. 1, p. 67-78, Feb. 2016.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-741, Dec. 1993.

REECE, E. A. Diabetes-Induced Birth Defects: What Do We Know? What Can We Do? **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 1, p. 24-32, Feb. 2012.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, Dec 1 2010.

SACKS, D. N.; ZIEVE, D.; OGILVIE, I. Amniocentesis - series - Procedure. 2015. Disponível em: <
https://medlineplus.gov/ency/presentations/100192_2.htm>. Acesso em: 16 fev. 2018.

SCHOBER, L. et al. Term and preterm labor: decreased suppressive activity and changes in composition of the regulatory T-cell pool. **Immunol Cell Biol**, v. 90, n. 10, p. 935-944, Nov. 2012.

SERHAN, C. N.; WARD, P. A.; GILROY, D. W. **Fundamentals of inflammation**. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2010.

SHARMA, T.; DAS, B. C. Higher incidence of spontaneous sister-chromatid exchanges (SCEs) and X-ray-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes during pregnancy. **Mutat Res**, v. 174, n. 1, p. 27-33, May. 1986.

SHARONY, R. et al. Is the ratio of maternal serum to amniotic fluid AFP superior to serum levels as a predictor of pregnancy complications? **Arch Gynecol Obstet**, v. 293, n. 4, p. 767-770, Apr. 2016.

SHIPP, T. D. et al. Outcome of singleton pregnancies with severe oligohydramnios in the second and third trimesters. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 7, n. 2, p. 108-113, Feb. 1996.

SILVA-GRECCO, R. L. et al. Micronucleated lymphocytes in parents of Down syndrome children. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 7, p. 573-577, Jul. 2012.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, Mar. 1988.

SLONIM, D. K. et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 23, p. 9425-9429, Jun. 2009.

SMITH, D. F. et al. Micronucleated erythrocytes as an index of cytogenetic damage in humans: demographic and dietary factors associated with micronucleated erythrocytes in splenectomized subjects. **Cancer Res**, v. 50, n. 16, p. 5049-5054, Aug. 1990.

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovasc J Afr**, v. 27, n. 2, p. 89-94, Mar./Apr. 2016.

SOUBHYE, J. et al. Myeloperoxidase as a Target for the Treatment of Inflammatory Syndromes: Mechanisms and Structure Activity Relationships of Inhibitors. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 35, p. 3975-4008, Jun. 2016.

STOLL, C. et al. Omphalocele and gastroschisis and associated malformations. **Am J Med Genet A**, v. 146a, n. 10, p. 1280-1285, May. 2008.

TAN, E. K.; TAN, E. L. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 27, n. 6, p. 791-802, Dec. 2013.

THOMAS, D. Gene--environment-wide association studies: emerging approaches. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 4, p. 259-272, Apr. 2010.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, Mar. 2000.

TODROS, T.; CAPUZZO, E.; GAGLIOTI, P. Prenatal diagnosis of congenital anomalies. **Images Paediatr Cardiol**, v. 3, n. 2, p. 3-18, Jun. 2001.

TOESCU, V. et al. Oxidative stress and normal pregnancy. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 57, n. 5, p. 609-613, Nov. 2002.

UNDERWOOD, M. A.; GILBERT, W. M.; SHERMAN, M. P. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. **J Perinatol**, v. 25, n. 5, p. 341-348, May 2005.

VERITY, C.; FIRTH, H.; FFRENCH-CONSTANT, C. Congenital abnormalities of the central nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 74, Suppl. 1, p. i3-8, Mar. 2003.

WALD, N. J. et al. Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects. **Lancet**, v. 1, n. 8026, p. 1323-1332, Jun. 1977.

WHO. World Health Organization. Congenital anomalies. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/> >. Acesso em: 11 jan. 2018.

WILKIE-GRANTHAM, R. P. et al. Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils. **J Biol Chem**, v. 290, n. 15, p. 9896-9905, Apr. 2015.

WILSON, D. M., 3RD; THOMPSON, L. H. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. **Mutat Res**, v. 616, n. 1-2, p. 11-23, Mar. 2007.

WU, Y. et al. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 245-254, Jan. 2012.

WYSZYNSKI, D. F. **Neural Tube Defects: From Origin to Treatment**. New York: Oxford University Press, 2005. 424 p.

YEOM, W. et al. Clinical characteristics and perinatal outcome of fetal hydrops. **Obstet Gynecol Sci**, v. 58, n. 2, p. 90-97, Mar. 2015.

ZBUCKA-KRETOWSKA, M. et al. Maternal plasma angiogenic and inflammatory factor profiling in foetal Down syndrome. v. 12, n. 12, p. 1-9, Dez. 2017.

ZHANG, H. et al. Effect of mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 genotype on cardioprotection in patients with congenital heart disease. **Eur Heart J**, v. 33, n. 13, p. 1606-1614, Jul. 2012.

ZUSTERZEEL, P. L. et al. Plasma protein carbonyls in nonpregnant, healthy pregnant and preeclamptic women. **Free Radic Res**, v. 33, n. 5, p. 471-476, Nov. 2000.

ANEXO I

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

(De acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC). Mutation Research, 204:379-406, 1988)

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com o seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas.

Obrigado pelo seu interesse.

1. Nome: _____

Data: ____/____/____

2. Para ser preenchido pelo pesquisador: Código n.: _____

Essa folha será destacada das demais do questionário e arquivada. Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaços adicionais forem necessários para completar uma resposta, por favor escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

Código n.: _____

HISTÓRIA PESSOAL

3. Data de hoje: _____.
4. Qual a sua idade? _____ (em anos).
5. Sexo: () Masculino () Feminino
6. A qual grupo étnico você pertence:
 () Caucasiano () Negro () Chinês () Japonês
 () Outro. Qual? _____.
7. Qual o seu estado civil?
 () Casado () Solteiro () Separado () Divorciado
 () Viúvo
8. De quantos filhos você é mãe natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que moram separadamente)?

HISTÓRIA DE FUMO

9. Alguma vez você fumou? () Sim () Não
 Se não, passe para a questão **10**. Se sim, continue:
- a) Quanto tempo você fumou? _____ (em anos)
- b) Você fuma atualmente? () Sim () Não
 Se sim, passe para a **9.c**
 Se não: Quando você parou de fumar? _____ (mês e ano).
- c) Você fuma cigarros? () Sim () Não
 Se sim, quantas carteiras por dia?
 () Menos de ½ carteira
 () ½ a 1 carteira
 () Mais de 1 carteira, quantas? _____
 Você fuma cigarros com filtro? () Sim () Não
 Qual a sua marca usual? _____.
- d) Você fuma charutos? () Sim () Não
 Se sim, quantos charutos por dia?
 () 1 charuto
 () 2 a 3 charutos
 () 4 ou mais charutos. Quantos? _____
- e) Você fuma cachimbo? () Sim () Não
 Se sim, quantas vezes por dia?
 () 1 vez
 () 2 a 3 vezes
 () 4 ou mais vezes. Quantas? _____
- f) O que você fumava no passado?
 () Cigarros

Código n.: _____

- () Charutos
 () Cachimbo
 g) Você mastiga tabaco? () Sim () Não

DIETAS**(deve refletir apenas os hábitos frequentes)**

10. Você come apenas vegetais? () Sim () Não

11. Você come carne? () Sim () Não

a) Se sim, com que frequência você come o seguinte:

	Dias por semana			
	1 a 2	3 a 4	5 a 6	todos dias
Carne bovina	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Galinha	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outras	()	()	()	()

b) Como você prefere sua carne? () Mal passada () No ponto
 () Bem passada

12. Você usa adoçantes? () Sim () Não

Quantos por dia? _____

13. Você bebe refrigerantes? () Sim () Não

Quantos por dia? _____

14. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc).

15. Você bebe café? () Sim () Não

Quantos xícaras pequenas por dia? _____

16. Você bebe chá? () Sim () Não

Quantos xícaras por dia? _____

17. Você toma chimarrão? () Sim () Não

Com que frequência? _____.

18. Você bebe cerveja? () Sim () Não

Se sim, por favor indique sua média de consumo semanal:

() 1-6 garrafas por semana ou menos.

() 7-12 garrafas por semana.

() 13-24 garrafas por semana.

() Mais de 24 garrafas por semana. Quantas? _____.

Código n.: _____

19. Você bebe vinho? () Sim () Não

Se sim, por favor indique sua média de consumo semanal:

() 1-4 copos por semana ou menos.

() 5-8 copos por semana.

() 9-16 copos por semana.

() Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____ .

20. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

() Sim () Não

Se sim, qual ou quais? _____

Por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1-4 copos por semana ou menos.

() 5-8 copos por semana.

() 9-16 copos por semana.

() Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____ .

HISTÓRIA GENÉTICA

21. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

() Sim () Não

Se sim, por favor especifique: _____

22. Você ou a sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar?

() Sim () Não

Se sim, por favor especifique: _____

23. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

() Sim () Não

24. Você tem um gêmeo idêntico vivo? () Sim () Não

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (sangue periférico):

Projeto: Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo de gestações que apresentam malformações fetais.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que consiste na avaliação das alterações encontradas no sangue de gestantes com malformações fetais. Esta pesquisa está associada ao projeto de mestrado de Flora Troina Maraslis, do programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. A realização deste estudo permitirá entender melhor a correlação entre as alterações fetais, estresse oxidativo e possível dano de DNA.

Se você aceitar, serão colhidas duas amostras de sangue de 4 mL e será aplicado um questionário. Na coleta de sangue você pode sentir algum desconforto e em alguns casos pode ocorrer a formação de um hematoma no local da punção. Durante os procedimentos de coleta de sangue e de dados você estará sempre acompanhado por um dos pesquisadores, que lhe prestará toda a assistência necessária ou acionará pessoal competente para isso.

Caso tenha alguma dúvida sobre os procedimentos ou sobre o projeto você poderá entrar em contato com o pesquisador a qualquer momento pelo telefone ou e-mail abaixo. Sinta-se absolutamente à vontade em não participar ou deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem ter que apresentar qualquer justificativa. Se decidir deixar de participar da pesquisa você não terá qualquer prejuízo no atendimento médico-laboratorial.

Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, onde será mostrado apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação na pesquisa. Você não terá nenhuma despesa advinda de sua participação nesta pesquisa, já que a coleta de amostra e aplicação do questionário serão realizadas neste

momento, sem custo algum. Com relação aos exames realizados, os resultados serão entregues a você pela pesquisadora principal que fará a orientação sobre os hábitos que favorecem a melhora dos indicadores de estresse oxidativo e melhora da qualidade de vida. Sua participação na pesquisa ajudará a compreender alguns fatores envolvidos nas malformações fetais, contribuindo para um melhor entendimento das alterações que ocorrem no organismo relacionadas às malformações.

Duas vias deste documento estão sendo rubricadas e assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa.

Eu,

RG _____, li este documento (ou tive este documento lido para mim por uma pessoa de confiança) e obtive dos pesquisadores todas as informações que julguei necessárias para me sentir esclarecido e optar por livre e espontânea vontade participar da pesquisa.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa. Você poderá entrar em contato com o pesquisador Prof. Sharbel Weidner Maluf, pelo telefone 3721-8081 (Laboratório de Análises Clínicas do HU UFSC), e-mail s.maluf@ufsc.br. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094, e-mail cep.propesq@contato.ufsc.br ou pessoalmente na rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC.

Data: ___ / ___ / ___.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário

Assinatura do Pesquisador Principal Flora Troina Maraslis

Assinatura do Pesquisador Responsável Sharbel Weidner Maluf

ANEXO III

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (líquido amniótico):

Projeto: Avaliação da instabilidade genômica e estresse oxidativo de gestações que apresentam malformações fetais

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que consiste na avaliação das alterações encontradas no líquido amniótico de gestantes com malformações fetais, a partir de uma alíquota da amostra coletada para realização dos exames que lhe foram solicitados por seu médico. Esta pesquisa está associada ao projeto de mestrado de Flora Troina Maraslis, do programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Se você aceitar, uma alíquota da amostra de líquido amniótico colhida para os exames solicitados pelo seu médico será utilizada para avaliação de estresse oxidativo e instabilidade genômica, e seu prontuário será consultado com o intuito de verificar se algum fator de saúde ou medicamentos utilizados podem estar relacionados aos resultados obtidos. Durante os procedimentos de coleta líquido amniótico e de dados você estará sempre acompanhado por um dos pesquisadores, que lhe prestará toda a assistência necessária ou acionará pessoal competente para isso.

A coleta de líquido amniótico é um procedimento obstétrico que consiste na coleta de líquido amniótico para fins diagnósticos e terapêuticos. A indicação mais comum é a pesquisa de doenças cromossômicas no feto, como Síndrome de Down, Edwards, Patau e Turner. Pode ser realizada no próprio consultório, sem necessidade de anestesia, na qual uma agulha fina é introduzida no abdome materno com o objetivo de alcançar a cavidade uterina. Esse procedimento é guiado por ultrassonografia para que o médico possa identificar um local longe do feto e da placenta, mas rico em líquido amniótico. Cerca de 20 mL de líquido são aspirados e enviados para avaliação genética.

A amniocentese transabdominal é uma técnica usual e largamente empregada com riscos considerados extremamente pequenos de acordo com as citações da literatura pertinente. Dentre eles, destacam-se punção placentária, punção fetal, punção do cordão, rotura da bolsa d'água, desencadeamento do parto e/ou aborto, infecções, enjoos, hemorragia materna e fracasso do procedimento. O risco materno é praticamente zero e o risco do procedimento provocar o abortamento é em torno de 1-2 para mil.

Com relação ao acompanhamento, a maternidade do HU-UFSC dispõe de uma equipe integrada multidisciplinar envolvida no

acolhimento da gestante e familiares com diagnóstico intrauterino de malformações composta por psicólogos, assistentes sociais, enfermeiras, médicos obstetras e geneticista. Além do diagnóstico, é oferecido acompanhamento por esses profissionais a fim de minimizar os efeitos psicossociais do processo, orientação psicológica, jurídica (em casos de interrupção da gestação por incompatibilidade com a vida), tratamento intrauterino quando disponível e aconselhamento genético para futuras gestações.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação na pesquisa. Você não terá nenhuma despesa advinda de sua participação nesta pesquisa, já que a coleta de amostra e aplicação do questionário serão realizadas neste momento, sem custo algum. Com relação aos exames realizados, os resultados serão entregues a você pela pesquisadora principal que fará a orientação sobre os hábitos que favorecem a melhora dos indicadores de estresse oxidativo e melhora da qualidade de vida. Sua participação na pesquisa ajudará a compreender alguns fatores envolvidos nas malformações fetais, contribuindo para um melhor entendimento das alterações que ocorrem no organismo relacionadas às malformações.

Caso tenha alguma dúvida sobre os procedimentos ou sobre o projeto você poderá entrar em contato com o pesquisador a qualquer momento pelo telefone ou e-mail abaixo. Sinta-se absolutamente à vontade em não participar ou deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem ter que apresentar qualquer justificativa. Se decidir deixar de participar da pesquisa você não terá qualquer prejuízo no atendimento médico-laboratorial.

Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, onde serão mostrados apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade.

Dois vias deste documento estão sendo rubricadas e assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa.

Eu, _____, li este documento (ou tive este documento lido para mim por uma pessoa de confiança) e obtive dos pesquisadores todas as informações que julguei necessárias para me sentir esclarecido e optar por livre e espontânea vontade participar da pesquisa.

O pesquisador responsável, que também assina esse documento, compromete-se a conduzir a pesquisa de acordo com o que preconiza a Resolução 466/12 de 12/06/2012, que trata dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa. Você poderá entrar em contato com o pesquisador (Prof. Sharbel Weidner Maluf) pelo telefone 3721-8081 (Laboratório de Análises Clínicas do HU UFSC), e-mail s.maluf@ufsc.br. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC pelo telefone (48) 3721-6094, e-mail cep.propesq@contato.ufsc.br ou pessoalmente na rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC.

Data: ___/___/___.

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário

Assinatura do Pesquisador Principal Flora Troina Maraslis

Assinatura do Pesquisador Responsável Sharbel Weidner Maluf