



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LETÍCIA KRAMER PACHECO

**ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS, ALTERAÇÕES
NUCLEARES E DANOS AO DNA NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E SANGUE
MATERNO E SUA CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E
MALFORMAÇÕES FETAIS**

FLORIANÓPOLIS

2023

LETÍCIA KRAMER PACHECO

**ANÁLISE DE MARCADORES BIOQUÍMICOS, ALTERAÇÕES
NUCLEARES E DANOS AO DNA NO LÍQUIDO AMNIÓTICO E SANGUE
MATERNO E SUA CORRELAÇÃO COM ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS E
MALFORMAÇÕES FETAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

FLORIANÓPOLIS

2023

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

Pacheco, Leticia Kramer

Análise de marcadores bioquímicos, alterações nucleares e danos ao DNA no líquido amniótico e sangue materno e sua correlação com alterações cromossômicas e malformações fetais / Leticia Kramer Pacheco ; orientador, Sharbel Weidner Maluf, 2023.

185 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Malformação fetal. 3. Dano ao DNA. 4. Marcadores bioquímicos. 5. Inflamação. I. Maluf, Sharbel Weidner . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Letícia Kramer Pacheco

Análise de marcadores bioquímicos, alterações nucleares e danos ao DNA no líquido amniótico e sangue materno e sua correlação com alterações cromossômicas e malformações fetais

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Dra. Luiza Emy Dorfman

Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS)

Prof^a Dra. Daniella Serafin Couto Vieira

Universidade Federal de Santa de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a Dra. Maria Claudia Santos Da Silva

Universidade Federal de Santa de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof^a. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo carinho, compreensão e apoio em todas as minhas jornadas.

Em especial as amigas Michelle e Emerita, pelo suporte indescritível durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, pela oportunidade de permitir esse crescimento profissional e aprender com os desafios da pós-graduação.

À banca analisadora desde trabalho pela disponibilidade e contribuições oferecidas.

A todos os funcionários, amigos e a chefia da ULAC, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. A ajuda com as coletas de sangue e a compreensão com a minha condição de funcionária/acadêmica foram fundamentais.

A todas as participantes desta pesquisa.

Aos funcionários do serviço de prontuário do paciente (SPP).

À toda equipe do LACEG, em especial a Natali pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Dra. Fabíola Monteiro e Carolina Siqueira pelo apoio e auxílio na realização da dosagem das citocinas e elaboração do artigo.

À equipe de Tocoginecologia do HU/UFSC/EBSERH, em especial à Patrícia, Mariza e Dra. Karine Souza da Correggio pelo apoio no dia das coletas de líquido amniótico.

A todos os professores das disciplinas que cursei durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia por permitir a realização deste trabalho.

À Moana, que entrou na minha vida no mesmo ano de início da pós e tem proporcionado muitos momentos felizes em minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

O período gestacional é acompanhado por importantes mudanças fisiológicas, hormonais e bioquímicas que permitem que se atinja um estado ideal, tanto para a mãe quanto para o embrião/feto. Quando a gestação se desvia do seu curso esperado, alguns marcadores podem ser usados para avaliar essas mudanças. O líquido amniótico (LQAM), por estar em contato direto com o embrião/feto, consiste em uma importante ferramenta para procedimentos de diagnóstico pré-natal. Marcadores bioquímicos como alfafetoproteína, homocisteína, vitamina B12 e folato têm sido estudados com relação a sua participação na ocorrência de malformações fetais. A determinação do cariótipo é a análise padrão para o diagnóstico de anomalias genéticas, enquanto a instabilidade genômica pode ser mensurada por meio das técnicas de cometa e micronúcleo. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a possível correlação entre marcadores bioquímicos com o dano ao DNA no LQAM e sangue materno, de gestantes com malformações fetais (GMF), submetidas à amniocentese. Foram quantificados marcadores inflamatórios no sangue e LQAM e verificada sua correlação com marcadores de danos ao DNA nos grupos estudados. Os resultados mostraram que dos 67 cariótipos determinados, 34 apresentavam alguma alteração, numérica ou estrutural. As principais aneuploidias encontradas foram a trissomia do 13, 18 e 21. Não foi verificada deficiência de folato e de vitamina B12 nos grupos estudados. A alfafetoproteína apresentou correlação negativa entre soro e LQAM, já vitamina B12, folato e homocisteína apresentaram correlação positiva. As dosagens de alfafetoproteína estavam maiores no LQAM de gestantes com fetos com trissomia do 13 e 18 com relação do 21. O índice total de dano ao DNA no sangue foi maior no grupo GMF em comparação aos grupos gestantes controle (GC) e não gestantes (NG). As células do LQAM apresentaram maior dano em relação aos linfócitos no grupo GMF. O grupo GMF apresentou aumento de micronúcleos em comparação aos grupos GC e NG. GMF não diferiu do grupo GC com relação as alterações pontes (NPB) e brotos (NBUD) nucleares. As dosagens de marcadores inflamatórios apresentaram concentrações maiores de MCP-1 e IL-1 β no sangue de GMF em comparação a GC. Comparando as concentrações dos marcadores inflamatórios entre sangue e LQAM do grupo GMF, IL-6 e MCP-1 apresentaram concentrações maiores no LQAM. TNF- α , IL-1 β e IFN- γ apresentaram concentrações maiores no plasma. IL-10 não diferiu. No sangue, foi encontrada correlação negativa entre IL-1 β e NBUD e correlação positiva entre IL-6 e IL-1 β com índice de divisão nuclear. No LQAM foi observada correlação positiva da idade gestacional (IG) com homocisteína e IFN- γ . Correlação negativa foi encontrada entre IG e alfafetoproteína, vitamina B12, folato, IL-10 e MCP-1. Os resultados obtidos pela técnica do cometa e frequência de micronúcleo indicam uma alta incidência de efeitos genotóxicos em mulheres gestantes com malformação fetal e nos seus fetos. Esses resultados permitem questionar se a presença de alguma malformação leva ao aumento do dano ao DNA, ou se a predisposição ao dano favoreceu a ocorrência de malformações. A presença de aneuploidias corrobora o aumento do processo inflamatório, como observado nas concentrações sanguíneas de MCP-1 e IL-1 β em GMF.

Palavras-chave: Malformação fetal. Marcadores bioquímicos. Dano ao DNA. Inflamação.

ABSTRACT

Gestational period is accompanied by important physiological, hormonal and biochemical changes that allow an ideal state to be reached for both the mother and the embryo/fetus. When pregnancy deviates from its expected course, some markers can be used to assess these changes. Amniotic fluid, as it is in direct contact with the embryo/fetus, is an important tool for prenatal diagnostic procedures. Biochemical markers such as alpha-fetoprotein, homocysteine, vitamin B12 and folate have been studied regarding their participation in the occurrence of foetal malformations. Karyotype determination is the standard analysis for diagnosing genetic abnormalities, while genomic instability can be measured using comet and micronucleus techniques. Thus, the objective of this work was to verify the possible correlation between biochemical markers and DNA damage in amniotic fluid (LQAM) and maternal blood, from pregnant women with foetal malformations (GMF), undergoing amniocentesis. Inflammatory markers were quantified in blood and amniotic fluid and their correlation with markers of DNA damage was verified in the groups studied. Results of research showed that of the 67 karyotypes determined, 34 presented some alteration, numerical or structural. The main aneuploidies found were trisomy 13, 18 and 21. There was no folate or vitamin B12 deficit in groups studied. Alpha-fetoprotein showed a negative correlation between serum and amniotic fluid, while vitamin B12, folate and homocysteine showed a positive correlation. Alpha-fetoprotein levels were higher in the amniotic fluid of pregnant women with fetuses with trisomy 13 and 18 compared to 21. The total rate of DNA damage in blood was higher in GMF group compared to pregnant control (GC) and non pregnant (NG) groups. Amniotic fluid cells showed greater damage compared to lymphocytes in the PFM group. The PFM group showed an increase in micronuclei compared to the GC and NG groups. GMF did not differ from the PC group regarding nuclear changes in nuclear bridges (NPB) and buds (NBUD). Dosages of inflammatory markers showed higher concentrations of MCP-1 and IL-1 β in blood of GMF group compared to PC. Comparing the concentrations of inflammatory markers between blood and amniotic fluid in the GMF group, IL-6 and MCP-1 showed higher concentrations in the amniotic fluid. TNF- α , IL-1 β and IFN- γ showed higher concentrations in plasma. IL-10 did not differ. In blood, a negative correlation was found between IL-1 β and NBUD and a positive correlation between IL-6 and IL-1 β with nuclear division index. In amniotic fluid, a positive correlation between gestational age (IG) and homocysteine and IFN- γ was observed. Negative correlation was found between IG and alpha-fetoprotein, vitamin B12, folate, IL-10 and MCP-1. Results obtained by comet technique and MN frequency indicate a high incidence of genotoxic effects in pregnant women with foetal malformations and their foetuses. These results allow us to question whether the presence of any malformation leads to increased DNA damage, or whether the predisposition to damage favored the occurrence of malformations. The presence of aneuploidies corroborates the increase in inflammatory process, as observed in blood concentrations of MCP-1 and IL-1 β in GMF.

Keywords: Foetal malformation. Biochemical markers. DNA damage. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da fecundação em humanos.	20
Figura 2. A primeira semana do desenvolvimento pré-natal do ser humano.	21
Figura 3. Aderência do blastocisto ao epitélio endometrial durante os primeiros estágios da implantação.....	23
Figura 4. Ilustração da progressão do fechamento do tubo neural.	25
Figura 5. Esquema da placenta e suas estruturas.	27
Figura 6. Ativação e infiltração de células imunes na interface materno-fetal no início da gestação.	37
Figura 7. Parte do fluxograma de pré-natal.	39
Figura 8. Avaliação da translucência nucal pela ultrassonografia.	42
Figura 9. Visão geral de defeitos do tubo neural.	43
Figura 10. Defeito do tubo neural específico por região.	44
Figura 11. Período gestacional versus o risco de indução de defeitos congênitos.	45
Figura 12. Efeitos patológicos de citocinas na gestação.	48
Figura 13. Erro na divisão meiótica.....	50
Figura 14. Rearranjos estruturais dos cromossomos.	51
Figura 15. Cariótipo com trissomia do cromossomo 21.....	52
Figura 16. Estrutura química da vitamina B12.....	62
Figura 17. Absorção e circulação entero-hepática da vitamina B12.	63
Figura 18. Estrutura química do folato.	64
Figura 19. Estrutura química da homocisteína.	66
Figura 20. Metabolismo da homocisteína.	67
Figura 21. Inter-relação folato, vitamina B12 e homocisteína.	69
Figura 22. Ilustração esquemática da amniocentese.....	71
Figura 23. Escore visual de dano ao DNA pela técnica do cometa.	73
Figura 24. Células analisadas pela técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).....	74
Figura 25. Coleta e cultivo de líquido amniótico.	77
Figura 26. Cariótipo normal 46 XY/XX.....	79
Figura 27. Fluxograma do estudo.	85

Figura 28. Comparação entre as concentrações sanguíneas de alfafetoproteína entre os grupos analisados.	91
Figura 29. Correlação entre as concentrações de alfafetoproteína no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.....	92
Figura 30. Comparação das concentrações de alfafetoproteína no líquido amniótico entre cariótipo normal e cariótipo com trissomia.	92
Figura 31. Comparação das concentrações de alfafetoproteína no líquido amniótico entre as trissomias.....	94
Figura 32. Comparação entre as concentrações sanguíneas de folato entre os grupos analisados.	94
Figura 33. Correlação entre as concentrações de folato no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.	95
Figura 34. Comparação entre as concentrações sanguíneas de vitamina B12 entre os grupos analisados.	96
Figura 35. Correlação entre as concentrações de vitamina B12 no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.....	97
Figura 36. Comparação entre as concentrações sanguíneas de homocisteína entre os grupos analisados.	98
Figura 37. Correlação entre as concentrações de homocisteína no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.....	98
Figura 38. Índice total de dano ao DNA pela técnica do cometa no sangue.	101
Figura 39. Comparação do índice total de dano ao DNA pela técnica do cometa no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.	102
Figura 40. Dano ao DNA quantificado pela técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).....	103
Figura 41. Concentrações plasmáticas de IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IFN- γ nos grupos estudados.	104
Figura 42. Comparação entre as concentrações de IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IFN- γ no plasma e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teratógenos e malformações congênitas associadas.	45
Tabela 2. Valores de referência de marcadores bioquímicos no sangue e líquido amniótico, conforme bula do reagente.	81
Tabela 3. Caracterização da população estudada.	87
Tabela 4. Perfil dos cariótipos determinados neste estudo.	88
Tabela 5. Alteração cromossômica numérica e achados ultrassonográficos.	89
Tabela 6. Alteração cromossômica estrutural e achados ultrassonográficos.	90
Tabela 7. Perfil etário das gestantes de fetos com trissomias.	90
Tabela 8. Comparação entre as concentrações sanguíneas dos marcadores bioquímicos em gestantes do grupo GMF com cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias.	99
Tabela 9. Comparação das concentrações de marcadores bioquímicos no líquido amniótico entre cariótipo fetal normal e com trissomias e entre as trissomias.	100
Tabela 10. Frequência de dano ao DNA avaliado pela técnica do cometa, nos grupos analisados.	101
Tabela 11. Comparação das concentrações de citocinas no sangue e no líquido amniótico entre os subgrupos com cariótipo normal e cariótipo com trissomia do grupo de gestantes com malformação fetal.	106
Tabela 12. Comparação das concentrações de citocinas no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal conforme o período gestacional.	107
Tabela 13. Correlação de Spearman para os dados quantitativos obtidos no sangue de gestantes com malformação fetal.	108
Tabela 14. Correlação de Spearman para os dados quantitativos obtidos no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Alfafetoproteína
CBMN	Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CD	Células dendríticas
GCPII	Glutamato carboxipeptidase II
DES	Dietilestilbestrol
DHF	Di-hidrofolato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
DTN	Defeito do tubo neural
DTT	Ditiotreitol
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
ERON	Espécie reativa de oxigênio e nitrogênio
FOL	Folato
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Gestantes controle
GMF	Gestantes com malformação fetal
HCG	Gonadotrofina coriônica humana

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOMO	Homocisteína
HSV	Herpes-vírus simples
HU	Hospital Universitário
IDN	Índice de divisão nuclear
IFN- γ	Interferon gama
IG	Idade Gestacional
IL	Interleucina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
ITD	Índice total de dano
KCl	Cloreto de Potássio
LACEG	Laboratório de Citogenética e Estabilidade Genômica
LPS	Lipopolissacarídeo
LQAM	Líquido amniótico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MIF	fator inibitório de migração de macrófagos
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1- α
MN	Micronúcleo
MS	Metionina sintase
MTHF	Metil-tetrahidrofolato
MTHFR	Metil-tetrahidrofolato redutase
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBUDs	Nuclear Buds ou Buds Nucleares
NK	Natural killer
NPBs	Nucleoplasmic bridges ou Pontes Nucleoplasmáticas

PAPP-A	Proteína A plasmática associada à gestação
PCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico
pH	Potencial hidrogeniônico
RCIU	Restrição do crescimento intrauterino
RF α	Receptor alfa de folato
SAF	Síndrome alcoólica fetal
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
STING	Estimulador de genes de interferon
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Transcobalamina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1/Th2	T helper 1/ T helper 2
THF	Tetra-hidrofolato
TN	Translucência nugal
TSH	Hormônio tireoestimulante
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Trisaminometano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URL	Unidade relativa de luz
ULAC	Unidade de Laboratório de Análises Clínicas
VB12	Vitamina B12

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
™	Trademark (marca registrada)
g	Força g ou força centrífuga relativa
h	Hora
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligramma
dL	Decilitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pg	Picograma
° C	Graus Celsius
V	Volts
μl	Microlitro
>	Maior que
<	Menor que
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo Geral	19
1.1.2 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 GESTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO FETAL	20
2.2 PLACENTA	25
2.3 LÍQUIDO AMNIÓTICO.....	27
2.4 FISIOLOGIA NORMAL DA GESTAÇÃO	29
2.4.1 Sistema Cardiovascular	29
2.4.2 Sistema Renal.....	30
2.4.3. Sistema Respiratório	31
2.4.4 Sistema Gastrointestinal	32
2.4.5 Sistema Endócrino	32
2.4.6 Sistema Hematológico	33
2.4.7 Sistema Imunológico.....	35
2.5 ACOMPANHAMENTO PRÉ-NATAL	39
2.6 MALFORMAÇÕES FETAIS	40
2.6.1 Anormalidades Cromossômicas	49
2.6.1.1 Trissomia do cromossomo 13 ou Síndrome de Patau	52
2.6.1.2 Trissomia do cromossomo 18 ou Síndrome de Edwards	53
2.6.1.3 Trissomia do cromossomo 21 ou Síndrome de Down.....	54
2.6.1.4 Monossomia do X ou Síndrome de Turner	55
2.7 ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL DURANTE A GESTAÇÃO.....	56
2.7.1 Marcadores Bioquímicos do Período Gestacional.....	56
2.7.1.1 Gonadotrofina coriônica humana (HCG)	56
2.7.1.2 Proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A).....	57
2.7.1.3 Inibina A.....	58
2.7.1.4 Alfafetoproteína (AFP).....	58
2.7.1.5 Estriol	60
2.7.1.6 Vitamina B12 (VB12)	61
2.7.1.7 Folato (FOL).....	64
2.7.1.8 Homocisteína (HOMO)	66
2.7.2 Inter-relação entre Folato, Vitamina B12 e Homocisteína	68
2.7.3 Análise Genética	69
2.7.3.1 Cariótipo Fetal	69

2.8 DANO AO DNA	71
2.8.1 MARCADORES DE DANO AO DNA	72
2.8.1.1 Técnica do Cometa	72
2.8.1.2	73
Técnica do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN citoma).....	73
3 SUJEITOS E MÉTODOS.....	75
3.1 SELEÇÃO DAS PARTICIPANTES	75
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO	76
3.3 COLETA DE AMOSTRAS	76
3.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS	77
3.4.1 Cariótipo fetal de líquido amniótico	77
3.4.2 Dosagem de marcadores bioquímicos.....	79
3.4.3 Técnica do Cometa/Eletroforese em Gel de Célula Única	81
3.4.4 Técnica de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN citoma).....	83
3.4.5 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em líquido amniótico e soro	84
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
3.6 FLUXOGRAMA DO ESTUDO	85
4 RESULTADOS	86
4.1 PERFIL DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA	86
4.2 ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	91
4.2.1 Alfafetoproteína	91
4.2.2 Folato	94
4.2.3 Vitamina B12	96
4.2.4 Homocisteína.....	97
4.3 MARCADORES DE DANO AO DNA E ALTERAÇÕES NUCLEARES	100
4.3.1 Quantificação do dano ao DNA pela técnica do cometa	100
4.3.2 Quantificação das alterações nucleares e dano ao DNA e pela técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese (CBMN)	102
4.3.3 Avaliação do Perfil Inflamatório.....	103
5 DISCUSSÃO	110
6 CONCLUSÃO.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Líquido amniótico)	174
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (sangue periférico)	176
ANEXO C - Questionário De Saúde Pessoal	178
ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética (CEPSH).....	181

1 INTRODUÇÃO

A gestação envolve uma complexa cascata dinâmica de processos fisiológicos. Após a concepção, células trofoblásticas fetais invadem o epitélio de transição mesenquimal e migram para o endométrio, promovendo angiogênese e estabelecendo a troca de nutrientes, gases e resíduos entre o feto e a mãe (KIM; KIM, 2017). Fatores genéticos e ambientais atuam como moduladores durante o curso da gestação (DADVAND et al., 2013).

Mudanças fisiológicas, hormonais e bioquímicas para alcançar um estado ideal, tanto para a mãe quanto para o embrião/feto, acompanham o processo gestacional. Marcadores bioquímicos, como por exemplo, gonadotrofina coriônica humana (HCG), proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A), inibina-A, α -fetoproteína (AFP), estriol não conjugado, vitamina B12 (VB12), folato (FOL) e homocisteína (HOMO) são usados para avaliar a saúde materna, placentária e fetal. Eles ajudam a diagnosticar e monitorar condições maternas, como diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, doença trofoblástica e anormalidades cromossômicas fetais, como a síndrome de Down (TRAN, 2006).

Fatores genéticos, nutricionais e ambientais maternos podem influenciar o desenvolvimento fetal e a saúde neonatal. Contudo, a etiologia da maioria das anormalidades fetais e neonatais ainda permanece desconhecida (FELDKAMP et al., 2017). Diversos estudos têm demonstrado que o estado nutricional materno desempenha um papel importante na saúde e no bem-estar da gestante e no desenvolvimento e saúde a longo prazo dos seus descendentes (BERMÚDEZ et al., 2015; BERTI et al., 2011).

As vitaminas FOL e VB12 são necessárias para a síntese de DNA e crescimento celular, e estão envolvidas no metabolismo da HOMO (FURNESS et al., 2013). A deficiência de qualquer dessas vitaminas leva ao aumento total da HOMO, o que justifica uma estreita relação entre elas e pode estar associada a ocorrência de danos ao embrião/feto (ALLEN, 1994).

Durante o período pré-concepcional, a gestação e o parto, a mulher pode estar exposta a diversos agentes capazes de ameaçar a estabilidade genômica fetal. O dano ao DNA pode ser induzido tanto por hábitos pessoais como alimentação, tabagismo, alcoolismo, o uso de drogas ilícitas, quanto por doenças pré-existentes ou adquiridas na gestação (hipertensão, diabetes e infecções) ou ainda pelo uso de fármacos (GELALETI et al., 2016; HILALI et al., 2013).

Anomalias cromossômicas podem ocorrer em qualquer gestação e podem ser uma das principais causas de fetos com malformações. É importante que os exames para avaliar a presença ou não de anormalidades cromossômicas apresentem o maior percentual possível de sensibilidade e especificidade. A determinação do cariótipo é a metodologia padrão ouro para análise cromossômica fetal, porém a obtenção de material para esta análise confirmatória requer a realização de procedimentos invasivos, de acordo com a idade gestacional, tais como amniocentese, biópsia de vilo corial e cordocentese (DEY; SHARMA; AGGARWAL, 2013; HIXSON et al., 2015).

Além disso, o processo inflamatório tem relevante participação nos estágios fisiológicos da gestação normal. A resposta inflamatória materna deve ser modulada para permitir o estabelecimento e manutenção de uma gestação viável (GUILBERT; ROBERTSON; WEGMANN, 1993). O desequilíbrio na produção de mediadores inflamatórios durante a gestação pode causar danos em diversos órgãos e sistemas, e levar a ocorrência de doenças graves, com impactos prejudiciais ao embrião/feto em desenvolvimento (YOCKEY; IWASAKI, 2018).

Muitos questionamentos a respeito das malformações fetais ainda não encontram respaldo na literatura. Assim, a necessidade de pesquisas na busca de conhecimento sobre o assunto é algo relevante. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi verificar a correlação entre marcadores bioquímicos com danos ao DNA no líquido amniótico (LQAM) e sangue materno de gestantes com indicação de investigação genética devido à presença de malformações fetais atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar a possível correlação entre marcadores bioquímicos com os danos ao DNA no líquido amniótico e sangue materno, de gestantes cujos fetos apresentavam malformações fetais, atendidas Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina, pertencente à rede de Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (HU-UFSC/EBSERH).

1.1.2 Objetivos Específicos

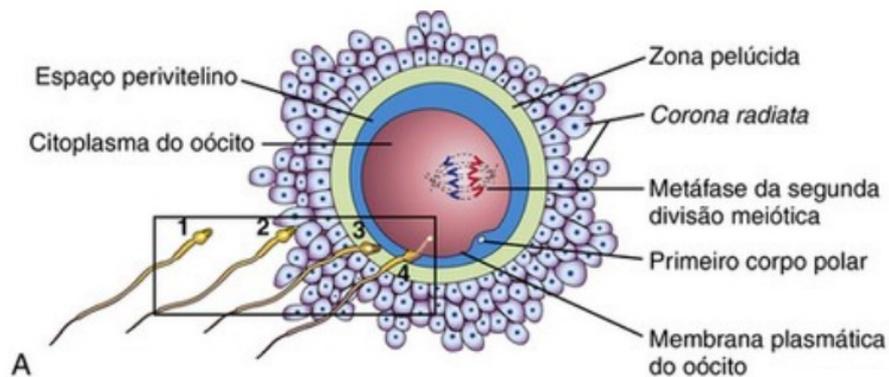
- Comparar as concentrações dos marcadores bioquímicos AFP, VB12, FOL e HOMO do sangue de gestantes submetidas à amniocentese, entre os grupos de gestantes sem intercorrências e mulheres não gestantes em idade fértil;
- Correlacionar as concentrações dos marcadores bioquímicos AFP, VB12, FOL e HOMO do sangue com as do LQAM de gestantes submetidas à amniocentese;
- Comparar as concentrações dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, IFN- γ e IL-10 do sangue de gestantes submetidas à amniocentese, com as de gestantes sem intercorrências e mulheres não gestantes em idade fértil;
- Comparar as concentrações dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, IFN- γ e IL-10 do sangue com as do LQAM de gestantes submetidas à amniocentese;
- Comparar os índices de danos ao DNA em leucócitos do sangue periférico de gestantes submetidas à amniocentese, com o de gestantes sem intercorrências e mulheres não gestantes em idade fértil;
- Comparar os índices de danos ao DNA em células do LQAM com células sanguíneas de gestantes submetidas à amniocentese;
- Correlacionar as concentrações dos marcadores bioquímicos, inflamatórios e de danos ao DNA das gestantes com fetos com malformações fetais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GESTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO FETAL

A gestação tem início com a fecundação, união do ovócito secundário com o espermatozoide (Figura 1), que ocorre na tuba uterina. Logo após essa união, o ovócito secundário termina a meiose, assim, cromossomos maternos e paternos se misturam, resultando na formação de um zigoto contendo 46 cromossomos (número diploide normal do cariótipo humano) alinhados na placa metafásica (SCHOENWOLF et al., 2016). Ainda como resultado da fecundação tem-se a variação da espécie, a determinação do sexo do embrião, a ativação metabólica da oótide (oócito quase maduro) e início da clivagem do zigoto (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Figura 1. Representação da fecundação em humanos.



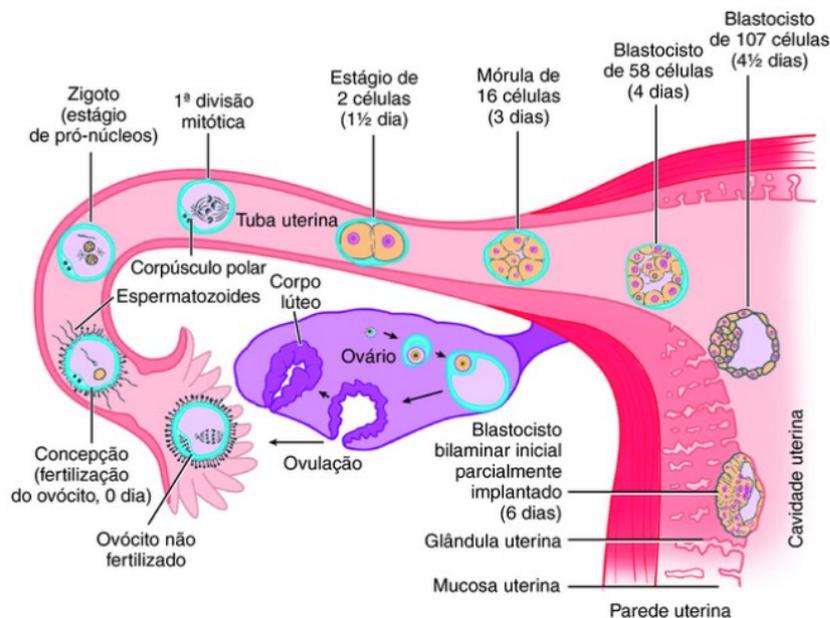
Fonte: (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016)

Até 24 horas após a fertilização, o zigoto inicia uma rápida série de divisões celulares mitóticas, denominada clivagem, que não é acompanhada por aumento do tamanho total do zigoto. As células subdividem o grande zigoto em várias células-filhas menores denominadas blastômeros, que originarão as células da mórula que por sua vez dará origem não somente ao embrião propriamente dito e a suas membranas extraembrionárias associadas, mas também à parte da placenta e suas estruturas associadas (Figura 2). Como uma adesão diferencial se desenvolve, as superfícies externas das células tornam-se convexas e as suas superfícies internas tornam-se côncavas. Essa reorganização, denominada compactação, também envolve

alterações no citoesqueleto do blastômero. Com a compactação, alguns blastômeros segregam para o centro da mórula e outros para a parte externa, originando o blastocisto. Os blastômeros localizados centralmente são agora denominados massa celular interna, enquanto os blastômeros da periferia constituem o trofoblasto. Como a massa celular interna dá origem ao embrião propriamente dito, ela também é denominada embrioblasto. O trofoblasto é a fonte primária do componente fetal da placenta (SCHOENWOLF et al., 2016).

A implantação do embrião humano (Figura 2) é um processo que ocorre em três estágios, aposição, adesão e invasão. Durante a aposição, quimiocinas e citocinas, produzidas pelas células endometriais, guiam o blastocisto até o local de implantação e a L-selectina embrionária liga-se a seus receptores no epitélio luminal, permitindo o contato inicial do blastocisto com o útero. Durante a adesão, a interação entre o blastocisto e o útero é estabelecida pela ligação das moléculas de adesão epitelial, como integrinas, aos seus receptores nas células trofoblásticas. A invasão do trofoblasto é regulada pela sua comunicação cruzada com os diferentes componentes celulares do endométrio (LESSEY, 2002; VAN MOURIK; MACKLON; HEIJNEN, 2009).

Figura 2. A primeira semana do desenvolvimento pré-natal do ser humano.

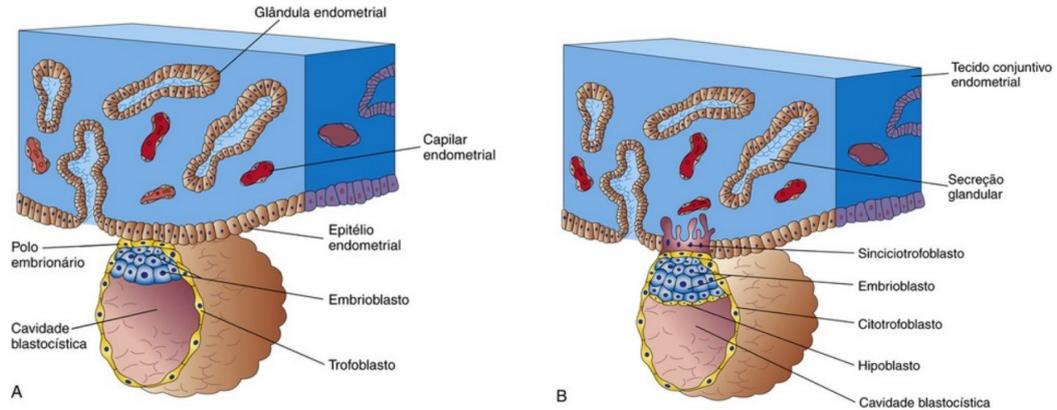


Fonte: SCHOENWOLF et al., 2016

Os mecanismos moleculares da implantação envolvem a sincronização entre o blastocisto invasor e um endométrio receptivo (Figura 3). As microvilosidades das células endometriais, integrinas, citocinas, prostaglandinas, hormônios (gonadotrofina coriônica humana e progesterona), fatores de crescimento, enzimas de matriz extracelular e outras enzimas (metaloproteinases de matriz e proteína quinase A) têm o papel de tornar o endométrio mais receptivo. Na sequência do processo de implantação, o trofoblasto se diferencia em duas camadas: um trofoblasto celular, denominado citotrofoblasto, e uma camada sincicial periférica que se expande, o sinciciotrofoblasto. Estas camadas do trofoblasto contribuem para formar as membranas extraembrionárias (SCHOENWOLF et al., 2016).

Durante a gestação, as células sinciciotrofoblásticas das vilosidades placentárias produzem em grandes quantidades o hormônio glicoproteico, HCG, que auxilia na manutenção da atividade hormonal do corpo lúteo no ovário, estimulando a produção de progesterona (MONTAGNANA et al., 2011). Os hormônios placentários são secretados principalmente pelo sinciciotrofoblasto, de forma altamente regulada. Esses hormônios são importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação, exercendo efeitos autócrinos e parácrinos que regulam a decidualização, o desenvolvimento placentário, a angiogênese, a receptividade endometrial, a implantação do embrião, a imunotolerância e o desenvolvimento fetal. Além disso, por serem liberados na circulação materna, o perfil de suas concentrações sanguíneas durante a gestação tem sido alvo de intensa pesquisa no sentido de encontrar potenciais biomarcadores robustos e confiáveis para prever e diagnosticar complicações associadas à gestação (COSTA, 2016).

Figura 3. Aderência do blastocisto ao epitélio endometrial durante os primeiros estágios da implantação.



A) O trofoblasto está aderido ao epitélio endometrial no polo embrionário do blastocisto (6 dias após a fecundação). B) O sinciotrofoblasto penetrou o epitélio e começou a invadir o tecido conjuntivo endometrial (7 dias após a fecundação).

Fonte: MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016

No decorrer da segunda semana gestacional, o embrioblasto se diferencia em duas camadas germinativas: o epiblasto e o hipoblasto. O tecido do embrião, assim como o epitélio amniótico e o alantoide, surgirá do epiblasto. O hipoblasto forma as células do saco vitelínico. Durante a terceira semana de desenvolvimento, o epiblasto experimenta uma série de mudanças complexas que levam à diferenciação de três camadas germinativas embrionárias: ectoderma, mesoderma e endoderma, que são as precursoras de todos os tecidos embrionários e órgãos, caracterizando a fase do desenvolvimento embrionário conhecida como gastrulação, que corresponde ao início da morfogênese (BARRESI; GILBERT, 2020). Durante este importante período, a exposição do embrião a certas drogas ou reagentes pode resultar em grandes malformações congênitas, porque os precursores dos principais sistemas de órgãos estão crescendo e se desenvolvendo a uma taxa considerável (LIU et al., 2014). Mesmo após o desenvolvimento da placenta, certas substâncias químicas conseguem ultrapassá-la e alcançar o embrião/feto em desenvolvimento, devido a algumas propriedades como baixo peso molecular, lipossolubilidade e habilidade de usar mecanismos de transporte ativo placentário (FALCK et al., 2015).

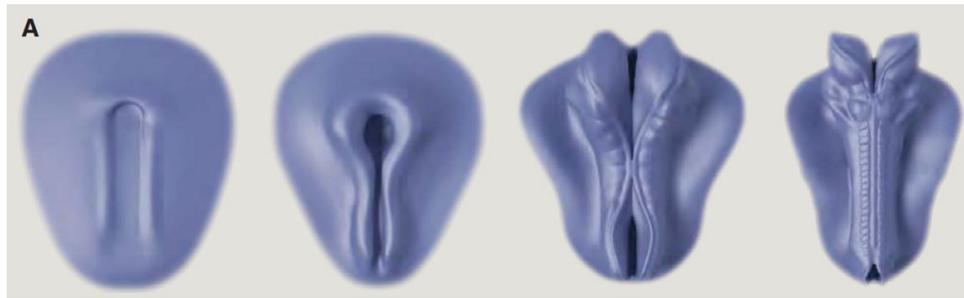
O ectoderma embrionário dá origem à epiderme, aos sistemas nervoso central e periférico, aos olhos e ouvidos internos, às células da crista neural e a muitos tecidos conjuntivos da cabeça. O endoderma é a fonte dos revestimentos epiteliais dos sistemas respiratório e digestório. O mesoderma dá origem a todos os músculos esqueléticos, às células sanguíneas, ao revestimento dos vasos sanguíneos, à musculatura lisa das vísceras, ao revestimento seroso de todas as cavidades do corpo, aos ductos e órgãos dos sistemas genitais e excretor e a maior parte do sistema cardiovascular (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

O processo envolvido na formação da placa neural e das pregas neurais e no fechamento das pregas para formar o tubo neural constitui a neurulação, que se completa até o final da 4ª semana, quando ocorre o fechamento do neuroporo caudal. A formação do tubo neural é um processo celular complexo e multifatorial que envolve uma cascata de mecanismos moleculares e fatores extrínsecos (BARRESI; GILBERT, 2020).

Na neurulação primária, a migração dorsal e medial das células da placa neural lateral cria pregas neurais que se fundem na linha média para formar o tubo neural (Figura 4). Notavelmente, a fusão das pregas neurais não ocorre simultaneamente em todo o embrião, mas é iniciada em vários locais ao longo do eixo rostral-caudal (GREENE; COPP, 2009; VAN STRAATEN et al., 1996). Após a fusão, os ápices das dobras neurais se remodelam para criar duas camadas epiteliais contínuas: um ectoderma da superfície externa e um tubo neural interno. A neurulação primária dá origem ao tubo neural que mais tarde se desenvolverá no cérebro e na maioria da medula espinhal (COPP; GREENE; MURDOCH, 2003).

Após a conclusão da neurulação primária, o tubo neural em regiões inferiores da futura coluna vertebral, caudal à região médio-sacral, é formado pelo processo de neurulação secundária, na qual o tubo neural se forma a partir de células mesenquimais que coalescem e sofrem epitelização. O epitélio então se canaliza e se torna contínuo com o tubo neural primário (COPP; BROOK, 1989; GREENE; COPP, 2009; SCHOENWOLF; FRANKS, 1984). A neurulação secundária é uma característica bem reconhecida do desenvolvimento humano e leva à formação do tubo neural nas regiões caudal sacral e coccígea (GREENE; COPP, 2009).

Figura 4. Ilustração da progressão do fechamento do tubo neural.



Fonte: WALLINGFORD et al., 2013.

Em suma, a etapa inicial do desenvolvimento humano vai desde a fertilização até a 8ª semana de desenvolvimento. Divide-se em período pré-embriônico (da 1ª primeira até a 3ª semana) e período embriônico (da 3ª até a 8ª semana). O desenvolvimento pré-embriônico inclui clivagem do zigoto, formação da mórula e implantação. O período embriônico se estende desde a implantação até o final da 8ª semana de desenvolvimento. Durante o período embriônico surgem as três camadas germinativas e a maioria dos sistemas de órgãos é estabelecida (LIU et al., 2014). O período gestacional compreendido entre 3 e 8 semanas é considerado o mais crítico por corresponder a organogênese (SELEVAN; KIMMEL; MENDOLA, 2000).

A partir da 9ª semana de gestação tem início o período fetal, que é voltado principalmente à maturação dos sistemas de órgãos e ao crescimento, e se estende até o parto (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

2.2 PLACENTA

O sinciciotrofoblasto, o citotrofoblasto e o mesoderma extraembrionário associados, junto com o útero, iniciam a formação da placenta. Durante este processo, o tecido fetal forma projeções, as vilosidades coriônicas, que se estendem para dentro dos sinusoides sanguíneos maternos (SCHOENWOLF et al., 2016).

A cobertura epitelial da árvore vilosa da placenta é o sinciciotrofoblasto, um verdadeiro sincício multinucleado que não apresenta fendas intercelulares para o espaço intervilloso. Este arranjo pode ajudar na prevenção da transmissão vertical de patógenos do sangue materno (ROBBINS et al., 2010). Devido a sua localização, o sinciciotrofoblasto é envolvido em muitas funções da placenta, tais como a síntese e secreção de grande quantidade

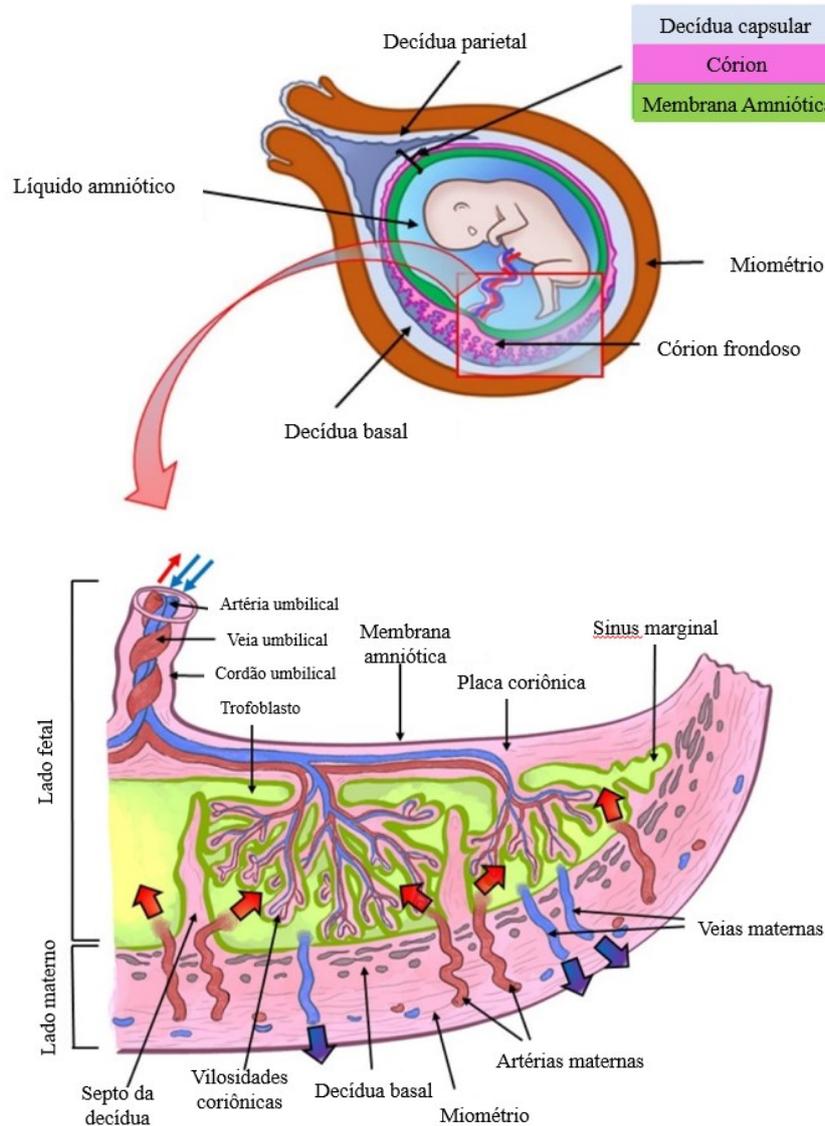
de esteróides e peptídeos, proteção contra xenobióticos e transporte ativo. Portanto, apresenta alta taxa metabólica, responsável por aproximadamente 40% do consumo total de oxigênio da unidade feto-placentária (CARTER, 2000).

Tanto o embrião quanto o feto recebem nutrientes e eliminam seus resíduos metabólicos por meio da placenta, órgão que apresenta tanto componentes maternos quanto fetais (Figura 5). A placenta madura consiste em uma massa de vilosidades fetais, que se projetam para um espaço interviloso revestido com sinciciotrofoblasto fetal preenchido com o sangue materno. O sangue fetal troca nutrientes com o sangue materno por meio da parede dos vasos das vilosidades. No entanto, a troca de nutrientes não é a única função da placenta; o órgão também secreta hormônios, incluindo esteroides sexuais que mantêm a gestação. Os anticorpos maternos atravessam a placenta para entrar no feto, onde fornecem proteção contra infecções fetais e neonatais. Contudo, alguns compostos teratogênicos e microrganismos também conseguem atravessar. O DNA fetal livre das células também atravessa a placenta e pode ser detectado no sangue materno. A placenta cresce juntamente com o feto, e ao nascimento ela pesa cerca de um sexto do peso fetal (SCHOENWOLF et al., 2016).

Além do relevante papel nas trocas fisiológicas, a placenta também participa do remodelamento das artérias espirais uterinas no início da gestação para estabelecer a circulação materna. Sua atividade endócrina possui forte efeito no metabolismo materno e sua função metabólica influencia o fornecimento de substratos adequados para o feto. A eficiência da troca placentária é governada por uma complexa interação entre o crescimento placentário, expressão de proteínas de transporte, taxas de fluxo sanguíneo placentário, gradientes de concentração transmembrana e demandas metabólicas dos tecidos placentários. Essa interação é orquestrada pelos hormônios maternos, placentários e fetais e, sob condições favoráveis, garantem um suprimento adequado ao feto sem esgotamento excessivo das reservas maternas (BURTON; FOWDEN, 2015).

Muitas complicações da gestação têm origem no desenvolvimento anormal da placenta no primeiro trimestre (SMITH, 2010). Essas incluem pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal uterino, natimorto, descolamento prematuro da placenta, trabalho de parto prematuro, sendo estas complicações conhecidas coletivamente como as grandes síndromes obstétricas (BROSENS et al., 2011).

Figura 5. Esquema da placenta e suas estruturas.



Fonte: Adaptado de SILINI et al., 2020

2.3 LÍQUIDO AMNIÓTICO

O LQAM desempenha importantes funções no desenvolvimento fetal, dentre elas, atua como uma barreira à infecção, permite o desenvolvimento normal do pulmão fetal, impede a aderência do âmnio ao embrião/feto, amortece os impactos recebidos pela mãe, ajuda no controle da temperatura corporal do embrião/feto por meio da manutenção de uma temperatura relativamente constante, permite que o feto se mova livremente, ajudando assim no desenvolvimento muscular, auxilia na manutenção da homeostase de líquidos e de

eletrólitos, bem como o fornecimento de nutrientes necessários durante a embriogênese (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016; UNDERWOOD; GILBERT; SHERMAN, 2005).

Ele é composto principalmente por água e eletrólitos (98 – 99%), além de células e substâncias químicas (1 – 2%) como enzimas e hormônios, proteínas, lipídios e glicose (CANANZI; DE COPPI, 2012; POLGÁR et al., 1989). As células do LQAM, geralmente chamadas de amniócitos, consistem em uma população heterogênea de vários tipos de células fetais, com várias morfologias, atividades e características, dependendo da idade gestacional e do desenvolvimento fetal, desde células totalmente diferenciadas e com linhagem comprometida, até células-tronco pluripotentes e altamente multipotentes (CANANZI; DE COPPI, 2012; LOUKOGEORGAKIS; DE COPPI, 2017; MURPHY; ATALA, 2013). Elas aumentam em número conforme a idade gestacional, com exceção de condições patológicas que afetam a renovação celular, como por exemplo, contagem reduzida em casos de atresia urogenital e contagem aumentada em casos de espinha bífida (GOSDEN; BROCK, 1978).

Seu volume aumenta de aproximadamente 30 mL em 10 semanas de gestação para 450 mL em 20 semanas, e de 800 a 1.000 mL em 37 semanas. A partir do início do quinto mês, o feto engole seu próprio LQAM e estima-se que ingira cerca de 400 mL por dia, quase metade do volume total. A urina fetal soma-se diariamente ao LQAM a partir do quinto mês, mas ela é composta principalmente por água, já que a placenta funciona como meio de troca para as escórias metabólicas. Durante o parto, a membrana amniocoriônica forma uma cunha hidrostática que ajuda a dilatar o canal cervical (SADLER, 2016). A queratinização da pele fetal começa em torno da 19^a– 20^a semana gestacional e geralmente está completa em 25 semanas após a concepção. Quando a queratinização está completa, a relação entre tamanho fetal e volume de LQAM deixa de ser linear. Por volta de 28 semanas de gestação, ele chega a um volume de 800 mL, o qual atinge um platô próximo ao termo da gestação e, posteriormente declina para 400 mL em 42 semanas (BRACE; WOLF, 1989).

O LQAM pode representar um meio válido para o estudo *in vitro* de alterações fetais, pois, contém células diferenciadas, progenitoras e tronco que representam os tecidos fetais (SEYED M. HOSEINI et al., 2020). Além disso, fornece informações sobre qualquer dano ao DNA fetal, além de ser potencialmente capaz de revelar a proteção conferida por um agente antigenotóxico (MOTTOLA et al., 2021). Hormônios, peptídios e proteínas do LQAM podem ser utilizados na triagem de doenças genéticas (TONG et al., 2009).

Volumes anormais, altos ou baixos, predizem maus resultados, portanto, uma quantidade normal de volume de líquido amniótico é crucial para o desenvolvimento saudável do embrião/feto. O líquido amniótico provou ser uma importante ferramenta de diagnóstico ao monitorar a progressão e a saúde de uma gestação (CAMPBELL et al., 1992; KORNACKI et al., 2017). O excesso de líquido amniótico (1.500 a 2.000 mL), conhecido como polidrâmnio, pode ser causado por obstrução do trato gastrointestinal, desordens genéticas, desordens músculo-esquelética ou hérnias diafragmáticas congênitas (KORNACKI et al., 2017). Enquanto a redução do volume (< 400 mL), conhecida como oligodrâmnio, pode ser causada por complicações tais como agenesia renal, obstrução do trato genitourinário e restrição do crescimento intrauterino (RCIU) (MOORE, 2011).

2.4 FISIOLOGIA NORMAL DA GESTAÇÃO

Durante a gestação, mudanças anatômicas e fisiológicas ocorrem para atender o aumento das necessidades metabólicas, para permitir o desenvolvimento apropriado do embrião/feto e preparar o corpo para o parto. As mudanças começam a ocorrer no início do primeiro trimestre, atingindo o pico a termo ou durante o trabalho de parto e retornando a condições pré-gestação poucas semanas pós-parto. Estas mudanças são bem toleradas em mulheres saudáveis, mas podem agravar ou mascarar alguma doença pré-existente ou alguma fisiopatologia relacionada à gestação (BHATIA; CHHABRA, 2018).

Algumas das alterações na fisiologia materna durante a gestação incluem, por exemplo, aumento da gordura materna e da água corporal total, redução da concentração das proteínas plasmáticas, especialmente a albumina, aumento do volume sanguíneo materno, do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo para os rins e para unidade uteroplacentária e redução da pressão sanguínea. A expansão do volume sanguíneo materno ocorre em proporção maior que o aumento da concentração de hemácias, o que resulta em anemia fisiológica e hemodiluição (COSTANTINE, 2014).

2.4.1 Sistema Cardiovascular

Alterações cardiovasculares durante a gestação incluem a expansão do volume plasmático, aumento do débito cardíaco, redução da resistência periférica e aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário. Essas adaptações facilitam o aumento progressivo da perfusão

uteroplacentária necessária para o crescimento e desenvolvimento fetal normal, previnem o desenvolvimento de hipertensão e fornecem uma reserva de sangue em antecipação a perda significativa de sangue associada ao parto. O genótipo e o fenótipo de cada mulher determinam sua capacidade de adaptação em resposta aos sinais moleculares que emanam da unidade fetoplacentária (OSOL; KO; MANDALÀ, 2019). Devido aos efeitos do aumento das concentrações de estrogênio e progesterona, a vasodilatação periférica e a consequente redução da resistência vascular sistêmica começam a ocorrer por volta da 8ª semana de gestação (GAISER, 2014). Como não há autorregulação na circulação uteroplacentária, o débito cardíaco precisa aumentar para manter a pressão arterial. No início da gestação, esse aumento do débito cardíaco é alcançado por um aumento na frequência cardíaca de 15 a 25%, seguido por um aumento do volume sistólico em 20 a 30% (ROBSON et al., 1989). A maior parte do aumento do débito cardíaco vai para o útero, rins e pele para fornecer nutrientes ao feto, excretar resíduos maternos e fetais e auxiliar no controle da temperatura materna, respectivamente (CHEUNG; LAFAYETTE, 2013; KATZ; SOKAL, 1980; PALMER et al., 1992).

O volume sanguíneo começa a aumentar entre a 6ª e 8ª semana de gestação para atingir um aumento máximo de cerca de 20% em meados do terceiro trimestre (UELAND, 1976). Uma pressão de pulso ampla e pressão arterial média reduzida levam à retenção de sódio e água pela ativação do sistema renina-angiotensina. Isso resulta em um aumento do volume plasmático de 40 – 50%. O volume diastólico final do ventrículo esquerdo é aumentado enquanto o volume sistólico final permanece inalterado, levando a um aumento na fração de ejeção. A pressão venosa central e capilar pulmonar permanecem inalteradas (CLARK et al., 1989).

2.4.2 Sistema Renal

O fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular estão aumentados, mas não são observadas mudanças na histologia e número de néfrons (CHEUNG; LAFAYETTE, 2013). Devido a ação da progesterona e a compressão mecânica dos ureteres, a pelve renal e os cálices estão dilatados. O aumento da taxa de filtração glomerular causa redução das concentrações de creatinina e ureia séricas. A responsividade vascular reduzida aos vasopressores (angiotensina II, norepinefrina e hormônio antidiurético) é observada devido a

expressão alterada do receptor vascular. A síntese de óxido nítrico está aumentada durante a gestação, resultando em vasodilatação sistêmica e renal (BHATIA; CHHABRA, 2018). Primeiro há dilatação da vasculatura renal e, como consequência, há um aumento compensatório na taxa de filtração glomerular e no fluxo plasmático renal efetivo (LINDHEIMER; DAVISON; KATZ, 2001).

O aumento substancial da taxa de filtração glomerular resulta em alterações das concentrações séricas de alguns analitos. A depuração de creatinina aumenta em torno de 25% no início da gestação, resultando na redução da creatinina sérica de aproximadamente 0,8 mg/dL para 0,5 mg/dL. A excreção urinária de proteínas, incluindo albumina, também está aumentada, complicando o diagnóstico e acompanhamento de doenças renais durante a gestação. Uma média de 200 mg e um máximo de 300 mg de proteína são excretadas em 24 horas (HIGBY et al., 1994).

A glicose também é excretada em quantidades maiores durante a gestação, tornando a glicosúria um achado inespecífico e não útil no diagnóstico de intolerância à glicose. A glicose continua a ser filtrada livremente, mas a reabsorção que ocorre por transporte ativo no túbulo proximal e, até certo ponto, no túbulo coletor é limitada devido ao rápido fluxo tubular. O sódio também é retido durante a gestação, o que ajuda a sustentar a expansão do plasma na vasculatura dilatada. Embora mais sódio seja filtrado, sua reabsorção pelo túbulo renal é aumentada (YEOMANS; GILSTRAP, 2005).

2.4.3. Sistema Respiratório

As alterações respiratórias proeminentes incluem: alterações mecânicas na parede torácica e no diafragma para acomodar o aumento do útero; uma redução na capacidade funcional residual e seus componentes volume de reserva expiratório e volume residual, com pouca ou nenhuma alteração na capacidade pulmonar total, além de aumento na ventilação por minuto, resultando em redução da pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) e alcalose respiratória crônica (HEGEWALD; CRAPO, 2011).

O aumento da progesterona durante a gestação induz uma mudança no limiar do centro respiratório do cérebro, aumentando a sensibilidade ao dióxido de carbono (JENSEN et al., 2008). Anatomicamente, o deslocamento ascendente do diafragma como resultado do

crescimento do útero gravídico leva a uma diminuição da capacidade residual funcional (GILROY; MANGURA; LAVIETES, 1988).

2.4.4 Sistema Gastrointestinal

Náuseas e vômitos afetam até 50% das mulheres durante a gestação, principalmente no primeiro trimestre (BROUSSARD; RICHTER, 1998). Concentrações elevadas de progesterona, fatores mecânicos e aumento do útero contribuem para o retardo do esvaziamento gástrico e aumento do volume do estômago (BEILIN, 1998).

A motilidade gástrica diminui ainda mais durante o trabalho de parto e permanece atrasada durante o período pós-parto imediato. Motilidade gástrica atrasada e tempo de trânsito gastrointestinal prolongado podem levar à constipação e alterar a biodisponibilidade de medicamentos (HUNT; MURRAY, 1958; PARRY; SHIELDS; TURNBULL, 1970).

Concentrações elevadas de progesterona reduzem o tônus do esfíncter esofágico inferior e aumentam a produção placentária de gastrina, aumentando a acidez gástrica. Essas alterações se combinam para aumentar a incidência de esofagite de refluxo e azia, afetando entre 50% e 80% das parturientes (CONKLIN, 1991). A gestação altera alguns valores laboratoriais relativos ao sistema gastrointestinal. As concentrações de transaminase e bilirrubina diminuem ligeiramente durante a gestação, mas as concentrações de fosfatase alcalina aumentam como resultado da produção placentária (HILL; PICKINPAUGH, 2008).

2.4.5 Sistema Endócrino

As várias alterações metabólicas que ocorrem durante a gestação são essenciais para atender às demandas do feto em crescimento e da placenta. No terceiro trimestre, a taxa metabólica basal aumenta em torno de 20% (BERGGREN et al., 2015). Ocorre um estado de hiperinsulinismo por hiperplasia das células das ilhotas do pâncreas juntamente com um estado de resistência periférica à insulina. Acredita-se que o lactogênio placentário humano e o hormônio de crescimento placentário humano contribuam para a resistência à insulina (BRELJE et al., 1993; RYAN; ENNS, 1988). O primeiro atua como uma molécula antagonista da insulina, fazendo com que as células pancreáticas secretem insulina e, ao mesmo tempo, induzindo resistência periférica à insulina (BRELJE et al., 1993). Isso garante

a disponibilidade de glicose para o feto, mantendo as concentrações de glicose pós-prandial elevadas (BUTLER et al., 2010; BUTTE, 2000). Ademais, o aumento da gliconeogênese hepática no terceiro trimestre contribui para manter as concentrações de glicose pós-prandial (ANGUEIRA et al., 2015).

Além do estado metabólico, vários órgãos secretores de hormônios, como a hipófise e a tireoide, sofrem mudanças drásticas. O estrogênio induz hiperplasia e hipertrofia de lactotrofos, resultando em um aumento das concentrações de prolactina (MOLITCH, 2011; TYSON et al., 1972).

A placenta também contribui para o meio hormonal, secretando o hormônio de crescimento sintetizado pelo sinciciotrofoblasto. O hormônio de crescimento placentário aumenta no meio da gestação, estimulando a liberação de fatores de crescimento semelhantes à insulina que contribuem para as características acromegálicas de algumas mulheres durante a gestação (FELDT-RASMUSSEN; MATHIESEN, 2011).

O HCG é estruturalmente semelhante ao hormônio tireoestimulante (TSH) e exerce efeito estimulatório nos receptores de TSH. As concentrações de HCG atingem o pico no final do primeiro trimestre gestacional, resultando em um aumento transitório nas concentrações de tiroxina livre (T4 livre) e triiodotironina livre (T3 livre) e uma queda nas concentrações de TSH (SMITH et al., 2017).

2.4.6 Sistema Hematológico

O volume sanguíneo materno se expande durante a gestação para permitir a adequada perfusão dos órgãos vitais, incluindo a unidade uteroplacentária e o feto e para preparar para perda sanguínea associada com o parto (LEE, 1991; WHITTAKER; MACPHAIL; LIND, 1996). Uma vantagem desse processo é que a viscosidade sanguínea se reduz, com o aumento da capacidade de carga das hemácias, garantindo uma troca mais eficiente entre mãe e feto (HUISMAN et al., 1987). As concentrações de hemoglobina materna estão reduzidas devido ao aumento do volume plasmático em relação ao volume eritrocitário, resultando em anemia fisiológica por diluição. Ademais, a transferência dos estoques de ferro para o feto contribui para essa anemia fisiológica (GOONEWARDENE; SHEHATA; HAMAD, 2012; NORTHCOTE; KNIGHT; BALLANTYNE, 1985).

Na gestação há uma leucocitose mediada por adrenocorticóides (NORTHCOTE; KNIGHT; BALLANTYNE, 1985). Neutrófilos são a maioria dos leucócitos na contagem diferencial (GATTI et al., 1994; KONIJNENBERG et al., 1997). A contagem de linfócitos diminui no primeiro e segundo trimestre e aumenta no terceiro trimestre gestacional. Há uma monocitose absoluta durante a gestação, especialmente no primeiro trimestre, decaindo com o avanço da gestação. Os monócitos ajudam na prevenção da rejeição do aloenxerto fetal infiltrando-se no tecido decidual, possivelmente, por imunossupressão mediada por prostaglandina E₂ (KLINE; WILLIAMS; HERNANDEZ-NINO, 2005). A razão monócito/linfócito encontra-se acentuadamente aumentada na gestação. Contudo, a contagem de eosinófilos e basófilos, não se altera significativamente (EDELSTAM et al., 2001).

A concentração de proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, está reduzida durante a gestação. Essa alteração pode influenciar a concentração plasmática de medicamentos que são fortemente ligados a proteínas (HILL; PICKINPAUGH, 2008).

O volume plasmático aumenta em 15% no primeiro trimestre e mais rapidamente durante o segundo trimestre, continuando em um ritmo mais lento durante o terceiro trimestre até atingir um platô nas poucas semanas antes do parto (BERNSTEIN, 2001; LUND; DONOVAN, 1967). Como resultado, há um ganho médio de 30 a 50% de volume de sangue em comparação com as concentrações de não gestantes (DE HAAS et al., 2017). Isso é vantajoso para a mãe e o feto em resposta às crescentes demandas metabólicas do período gestacional e, mais importante, serve como um tampão protetor para minimizar as consequências da perda de grande volume de sangue durante o parto. Acredita-se que o aumento do volume plasmático materno esteja relacionado ao efeito combinado de atividade mineralocorticoide e da vasopressina, causando retenção de água e sódio durante a gestação. Este aumento do volume plasmático permite a adequada perfusão aos órgãos e pode fornecer algum benefício de sobrevivência necessário em antecipação à perda de sangue no momento do parto vaginal ou cesárea (SCAIFE; MOHAUPT, 2017).

Quanto aos componentes do sangue, a regulação positiva da eritropoiese, induzida pelo hormônio eritropoetina dos rins maternos, aumenta a massa de glóbulos vermelhos. No entanto, esse aumento é inferior ao aumento do volume plasmático, resultando em anemia dilucional, ou mais clinicamente conhecida como “anemia da gestação”(GOONEWARDENE; SHEHATA; HAMAD, 2012).

As necessidades de ferro aumentam na segunda metade da gestação, e é de suma importância que a suplementação deste elemento ocorra desde o início do período gestacional, para evitar morbidade materna e neonatal, particularmente baixo peso ao nascer ou hemorragia grave (AHMADZIA et al., 2018; HAIDER et al., 2013; PEÑA-ROSAS; VITERI, 2006).

2.4.7 Sistema Imunológico

Uma gestação bem-sucedida requer comunicações cuidadosamente coordenadas entre a mãe e o embrião/feto. Células imunes e vias de sinalização de citocinas participam como mediadoras dessas comunicações para promover uma gestação saudável. A implantação do embrião é o estágio inicial do processo gestacional e envolve a aposição do blastocisto com o endométrio uterino, seguido de fixação e invasão do blastocisto no endométrio e reconstrução da decídua pelo trofotoderma invasivo (MOR et al., 2011). A receptividade endometrial adequada é considerada uma pré-condição fundamental para a implantação bem-sucedida do embrião. Estudos baseados em experimentos humanos e animais demonstraram que o período de peri-implantação é acompanhado pela ativação e infiltração de várias células imunes (Figura 6) (ACHACHE; REVEL, 2006). A resposta inflamatória materna é supostamente modulada para permitir o estabelecimento e a manutenção de uma gestação viável (GUILBERT; ROBERTSON; WEGMANN, 1993). Dessa forma, os processos inflamatórios que ocorrem na interface materno-fetal são essenciais para que haja a implantação normal na gestação humana (CHALLIS et al., 2009; CHRISTIANSEN; NIELSEN; KOLTE, 2006; KOCH; PLATT, 2007).

Alguns estudos consideram a gestação como um processo de conversão mútua entre condições pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (MOR; ALDO; ALVERO, 2017), dividindo, portanto, a gestação em três estados imunológicos distintos que correspondem aos diferentes estágios do desenvolvimento fetal: primeiro, um estágio pró-inflamatório associado à implantação do embrião e à placentação (DEKEL et al., 2014; GNAINSKY et al., 2015; ZENCLUSSEN; HÄMMERLING, 2015); segundo, um estágio anti-inflamatório associado ao crescimento fetal (ERLEBACHER, 2013; SAITO et al., 2010); e terceiro, uma mudança do estágio anti-inflamatório para um estágio pró-inflamatório necessário para o início do trabalho de parto (EDEY et al., 2016; LINDSTRÖM; BENNETT, 2005).

A gestação normal é conhecida por evocar uma resposta inflamatória sistêmica, que está associada a evidências de aumento do estresse oxidativo à medida que a gestação avança em termos de vários marcadores circulantes, particularmente lipídios oxidados e F2-isoprostano. A inflamação pode ser estimada por vários indicadores, refletindo diferentes partes da reação inflamatória *in vivo* (PALM et al., 2009).

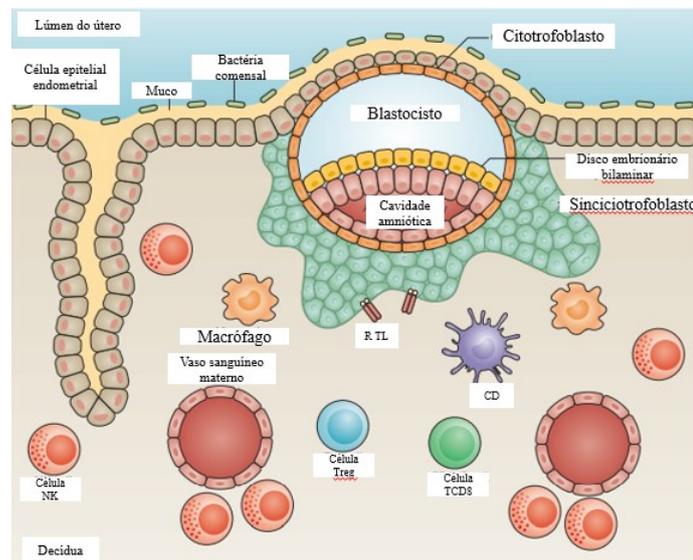
O trofoblasto desencadeia a produção de citocinas para estimular o recrutamento e a diferenciação das células imunes, dando-lhes um fenótipo para uma gestação bem-sucedida (SVENSSON-ARVELUND et al., 2015). Portanto, permite que as células trofoblásticas analisem e respondam contra essas moléculas de sinalização específicas. Em síntese, as células trofoblásticas treinam as células imunes e fornecem respostas de sinalização de uma maneira única que ajuda a desempenhar várias funções de crescimento e desenvolvimento fetal (MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

Fatores externos, como células imunes decíduais e reguladores intrínsecos, como receptores Toll like e interferons, desempenham papéis na manutenção da função placentária durante a gestação (KOGA; MOR, 2010). A importância desses mecanismos para a gestação normal é ilustrada pelas patologias resultantes quando eles são perdidos ou desregulados. Em mulheres gestantes hípidas, há evidências de que essas células são críticas para o desenvolvimento da placenta, regulando a formação da artéria espiral e controlando a invasão do trofoblasto no endométrio, provavelmente pela secreção de citocinas que promovem a gestação (MOFFETT-KING, 2002). Os fatores produzidos no local de implantação são críticos para manter o fenótipo pró-gestação dessas células. Um desses fatores envolvidos na promoção da gestação é a interleucina 10 (IL-10) (MURPHY et al., 2005a; THAXTON; SHARMA, 2010). Embora o mecanismo não esteja completamente definido, há evidências de que seja um importante regulador da atividade citotóxica das células natural killer (NK) uterinas. Em camundongos sem IL-10, doses muito baixas de lipopolissacarídeo (LPS) induzem uma resposta inflamatória e ativação de NK uterinas, resultando em morte fetal (MURPHY et al., 2005). Curiosamente, em alguns casos de abortos espontâneos inexplicados, verificou-se que havia concentrações mais baixas dessa citocina, apoiando ainda mais a possibilidade de que o equilíbrio celular IL-10 e NK controle a inflamação excessiva e promova gestações saudáveis (PLEVYAK et al., 2002; ROBERTSON; SKINNER; CARE, 2006).

Um equilíbrio cuidadoso entre tolerância imunológica contra antígenos fetais e imunidade contra agentes infecciosos precisa ser mantido. A propriedade imunossupressora das células T regulatórias (Treg) permite a essa linhagem de linfócitos T um papel fundamental no estabelecimento e manutenção da tolerância materna aos aloantígenos fetais, o que é necessário para uma gestação bem-sucedida (HUANG; CHI; QIAO, 2020).

Sugere-se que o principal regulador deste processo inflamatório sejam as células NK uterinas (CHRISTIANSEN; NIELSEN; KOLTE, 2006). Células NK específicas do útero, macrófagos e células dendríticas são recrutadas no local de implantação e exercem efeitos imunorregulatórios proeminentes durante o início da gestação. Aquelas são as células imunes mais abundantes, localizadas na decídua humana durante o início da gestação, enquanto os macrófagos e as células dendríticas atuam como células apresentadoras de antígenos que se infiltram na decídua. A comunicação entre essas células desempenha um papel essencial na regulação da invasão do trofoblasto e na promoção da remodelação da artéria uterina espiral (ACAR; USTUNEL; DEMIR, 2011; LIU et al., 2017; PLAKS et al., 2008).

Figura 6. Ativação e infiltração de células imunes na interface materno-fetal no início da gestação.



Legenda: O estágio inicial da gestação é caracterizado pela participação da resposta imune inata e adaptativa, incluindo células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (CDs), Células T CD8⁺ e Células T reguladoras (Treg).

Fonte: Adaptado de MOR; ALDO; ALVERO, 2017

Alterações ou ativações anormais de respostas imunes durante a gestação podem levar a ocorrência de complicações e anormalidades congênitas. A expressão exacerbada de citocinas pode configurar como mediador crítico das desordens congênitas e perda fetal, que ocorre no contexto de infecções, anormalidades cromossômicas, doenças metabólicas e autoimunes. Ao mesmo tempo, certas infecções ou condições inflamatórias em gestantes causam doenças e têm impactos prejudiciais sobre o desenvolvimento do feto (YOCKEY; IWASAKI, 2018).

No local da implantação, a inflamação é caracterizada pela presença de interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-15, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, ligante de quimiocina CXCL1, ligante 4 de quimiocina CC, osteopontina e fator de necrose tumoral (TNF), que são derivados de células do estroma endometrial e de células imunes infiltrantes, recrutadas para o sítio de implantação (NORWITZ et al., 2015; YOSHINAGA, 2008).

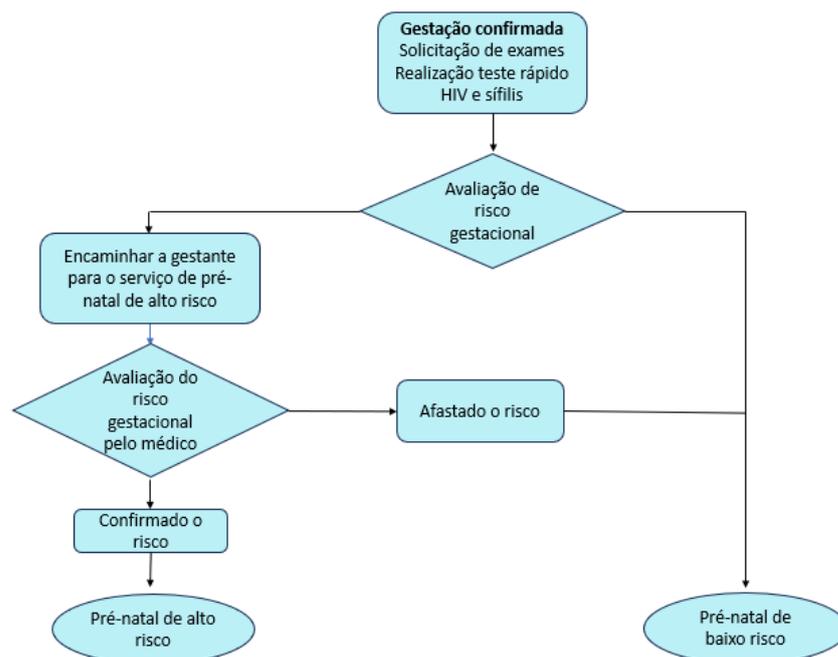
Citocinas e quimiocinas, como fator estimulador de colônias 1, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1- α (MIP-1 α), fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) são fatores-chave envolvidos no recrutamento e regulação de macrófagos decíduais durante a gestação (ARCURI et al., 2007; JOKHI et al., 1995; LOCKWOOD et al., 2006). A MCP-1 desempenha papel importante na regulação da migração de monócitos pelas células trofoblásticas e na regulação dos macrófagos M1/M2 durante o início da gestação (DRAKE et al., 2001; SVENSSON-ARVELUND et al., 2015).

O interferon gama (IFN- γ) é uma citocina pró-inflamatória secretada no útero durante o início da gestação. É abundantemente produzido pelas células NK uterinas no endométrio materno, mas também pelos trofoblastos em algumas espécies (MURPHY et al., 2009). O parto é mediado por uma resposta inflamatória. Macrófagos e neutrófilos infiltram-se no miométrio uterino. A interleucina IL-1 β é secretada e induz contração muscular (YOCKEY; IWASAKI, 2018). A IL-10 exerce principalmente seu efeito anti-inflamatório inibindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF, bem como quimiocinas (SARAIWA; O'GARRA, 2010).

2.5 ACOMPANHAMENTO PRÉ-NATAL

O acompanhamento pré-natal deve ser iniciado preferencialmente até a 12ª semana de gestação. É um processo periódico e contínuo de todas as gestantes, para assegurar seu seguimento durante toda a gestação, em intervalos preestabelecidos (mensalmente, até a 28ª semana; quinzenalmente, da 28ª até a 36ª semana; semanalmente, no termo), acompanhando-as tanto nas unidades de saúde quanto em seus domicílios, bem como em reuniões comunitárias, até o momento do pré-parto/parto, objetivando seu encaminhamento oportuno ao centro obstétrico, assim como para a consulta na unidade de saúde após o parto. De acordo com o fluxograma de pré-natal, o risco gestacional deve ser avaliado e quando confirmado, encaminhado ao pré-natal de alto risco ou à urgência/emergência obstétrica (Figura 7) (BRASIL, 2012).

Figura 7. Parte do fluxograma de pré-natal.



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012

Os exames de rotina para triagem de situações clínicas de maior risco no pré-natal são solicitados no acolhimento da mulher no serviço de saúde, imediatamente após o diagnóstico da gestação. Alguns exames solicitados deverão ser repetidos no início do terceiro

trimestre. Dentre os exames preconizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) que fazem parte do pré-natal pode-se citar: hemograma completo, tipagem sanguínea, sorologia para sífilis, glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose para casos triados com fator de risco para diabetes gestacional presente e/ou com glicemia de jejum inicial maior ou igual a 85 mg/dL, exame de urina tipo I, urocultura, sorologia anti-HIV, sorologia para toxoplasmose, para hepatite B, parasitológico de fezes, colpocitologia oncótica, bacterioscopia da secreção vaginal. Além desses exames bioquímicos, também é preconizada a realização de ultrassonografia obstétrica. O primeiro ultrassom pode ser realizado entre a 10^a e a 13^a semana e deve se repetir entre a 20^a e a 24^a semana de gestação (BRASIL, 2012).

Com o advento da ultrassonografia de alta resolução, uma avaliação bastante completa da anatomia fetal pode ser realizada mesmo em idade gestacional precoce, na qual a maioria dos defeitos fetais estruturais significativos são detectáveis (BECKER; WEGNER, 2006; CARVALHO et al., 2002; ECONOMIDES; BRAITHWAITE, 1998; SMRCEK et al., 2003; SOUKA et al., 2006).

Inserido no rol de cuidados durante a gestação, o Ministério da Saúde possui um guia alimentar para gestantes. A alimentação saudável durante a gestação favorece o bom desenvolvimento fetal, a saúde e o bem-estar da gestante, além de prevenir o surgimento de agravos, como diabetes gestacional, hipertensão e ganho de peso excessivo (BRASIL, 2012).

Sabe-se que tanto a nutrição materna quanto o metabolismo de aminoácidos na unidade feto-materna afetam a organogênese fetal. A investigação experimental sobre a organogênese mostra o papel fundamental da disponibilidade adequada de proteínas, bem como da ingestão calórica total (HOET; HANSON, 1999).

A melhora nutricional e do estado de saúde das mulheres antes e durante a gestação irá contribuir para o crescimento fetal ideal, resultados obstétricos favoráveis, melhora da sobrevivência perinatal e melhor saúde a longo prazo tanto para a mãe quanto para a prole. Uma dieta que restrinja de forma consistente e substancial qualquer macronutriente deve ser evitada durante gestação (MARSHALL et al., 2022).

2.6 MALFORMAÇÕES FETAIS

As anomalias congênitas são alterações estruturais ou funcionais que ocorrem durante o desenvolvimento e podem ser detectadas antes, durante ou após o nascimento.

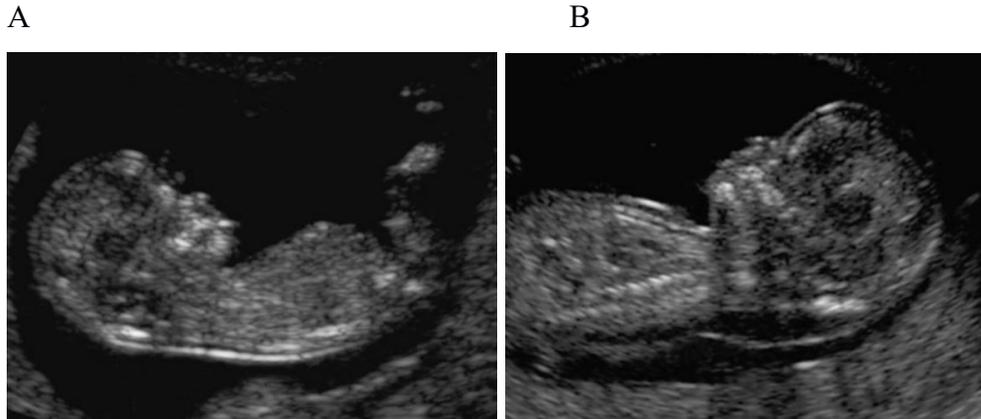
Diferentes tipos de fatores de risco (genéticos, infecciosos, nutricionais, ambientais, entre outros) podem atuar de forma separada ou conjunta na ocorrência de anomalias congênitas em diversos órgãos e sistemas do corpo humano (BRASIL, 2022).

Os defeitos congênitos dividem-se em três categorias: aqueles causados por fatores ambientais (15%), os causados por fatores genéticos (30%) e causados por uma interação do ambiente com uma suscetibilidade genética da pessoa. A maioria dos defeitos congênitos deve-se à última categoria (55%) e desconhecem-se detalhes da origem da maioria dessas malformações congênitas (SADLER, 2016).

Estima-se que 6% dos bebês em todo o mundo nasçam com um distúrbio congênito, resultando em centenas de milhares de mortes associadas. No entanto, o número real de casos pode ser muito maior porque as estatísticas geralmente não consideram gestações interrompidas e natimortos. As anomalias congênitas severas mais comuns são defeitos cardíacos, defeitos do tubo neural e síndrome de Down. Embora os distúrbios congênitos possam ser o resultado de um ou mais fatores genéticos, infecciosos, nutricionais ou ambientais, muitas vezes é difícil identificar as causas exatas (WHO, 2023).

Uma avaliação importante na triagem de malformações fetais é a translucência nucal (TN) (Figura 8), que consiste na aparência ultrassonográfica do acúmulo subcutâneo de líquido na região da nuca fetal, e que deve ser realizada no primeiro trimestre gestacional (entre a 11^a e 14^a semana). A TN aumentada, além de constituir expressão fenotípica comum em fetos portadores de defeitos cromossômicos, também está associada a maior incidência de malformações estruturais, especialmente os defeitos cardíacos. Dentre diversas outras malformações associadas já descritas, pode-se destacar: defeitos do diafragma, anomalias renais, anomalias de parede abdominal, ampla variedade de displasias esqueléticas, síndromes raras e possivelmente, infecções congênitas, além do risco aumentado da ocorrência de aborto espontâneo (HYETT et al., 1999; NICOLAIDES, 2004; RAYBURN; JOLLEY; SIMPSON, 2015; SNIJDERS et al., 1998 (HYETT; MOSCOSO; NICOLAIDES, 1995; MATIAS et al., 1999; MAVRIDES et al., 2001; MICHAILIDIS; ECONOMIDES, 2001; SOUKA et al., 2001). Contudo, nem a incidência de anormalidade cromossômica, nem seu prognóstico pode ser confirmado apenas pela TN (CULLEN et al., 1990). Os riscos para presença de alterações cromossômicas são maiores quando a medida da TN é superior a 3,5 mm (SOUKA et al., 2001).

Figura 8. Avaliação da translucência nugal pela ultrassonografia.



Legenda: A) Feto 12 semanas de idade gestacional e translucência nugal normal (1,4 mm).

B) Feto com 12 semanas e translucência nugal aumentada (4,2 mm).

Fonte: HAAK, 2003

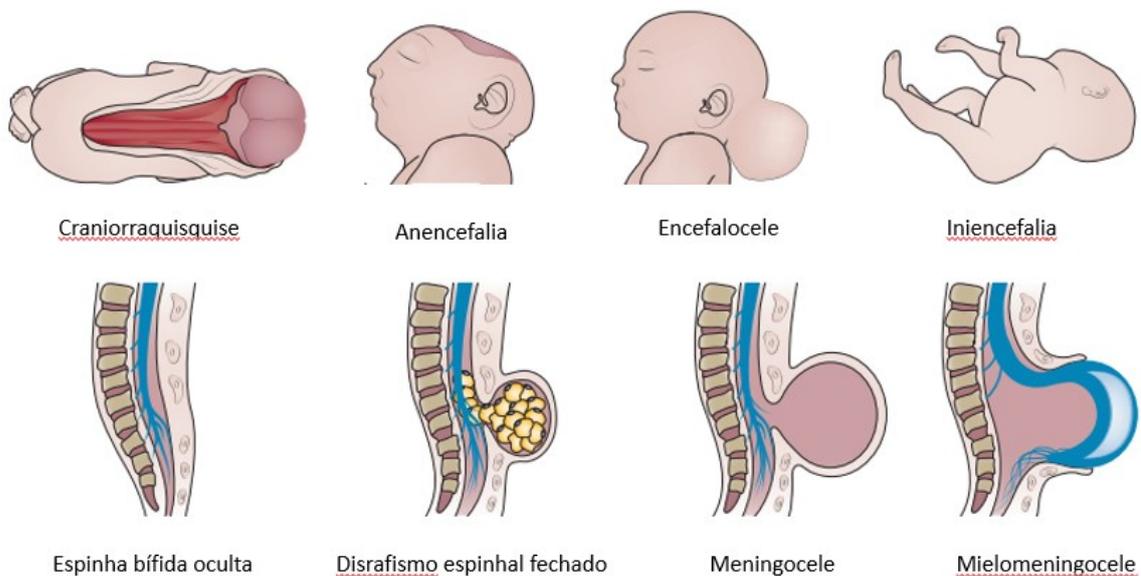
A área translúcida desaparece após 14 semanas de gestação, quando o tecido subcutâneo se torna mais ecogênico. A TN é, portanto, um fenômeno transitório (ROBERTS et al., 1995). Contudo, em alguns casos evolui para edema de nuca ou higromas císticos (AZAR et al., 1991; HAAK, 2003; NICOLAIDES et al., 1992). O higroma cístico é uma malformação vascular-linfática que se desenvolve no final da 6ª semana de gestação. É anatomicamente caracterizado por dilatação dos ductos linfáticos devido à falta de comunicação entre os sistemas linfático e venoso (CHERVENAK et al., 1983). Pode estar associado à aneuploidia e outras malformações estruturais. Se associado à aneuploidia, dificilmente se apresenta de forma isolada. Caso esteja associado a outras malformações estruturais o prognóstico é desfavorável (BAXI et al., 2009; MALONE et al., 2005).

Algumas malformações fetais podem ser determinadas pelo exame ultrassonográfico, dentre elas, defeitos do tubo neural (DTNs), como anencefalia e espinha bífida; defeitos na parede abdominal, como onfalocele e gastrosquise; e defeitos cardíacos e faciais, que incluem fendas labial e/ou palatina (SADLER, 2016).

Os DTNs constituem um grupo complexo e heterogêneo de anomalias congênitas do sistema nervoso central (SNC) e abrangem uma ampla gama de malformações morfológicamente distintas, afetando cerca de 0,5-2 a cada 1000 gestações estabelecidas em todo o mundo (MITCHELL, 2005; COPP; GREENE, 2010). Dentre eles, pode-se citar anencefalia, encefalocele, meningocele cérebro-espinhal e espinha bífida (Figura 9) (AVAGLIANO et al., 2019). Classicamente, os DTNs são divididos em dois subgrupos:

defeitos abertos e defeitos fechados. Os abertos referem-se a um defeito no qual os tecidos neurais se comunicam com o ambiente externo, como é o caso da meningocele e mielomeningocele (ADZICK, 2010). Enquanto os fechados são a forma mais branda de DTN e envolvem um defeito vertebral oculto com envolvimento neural mínimo (NORTHRUP; VOLCIK, 2000).

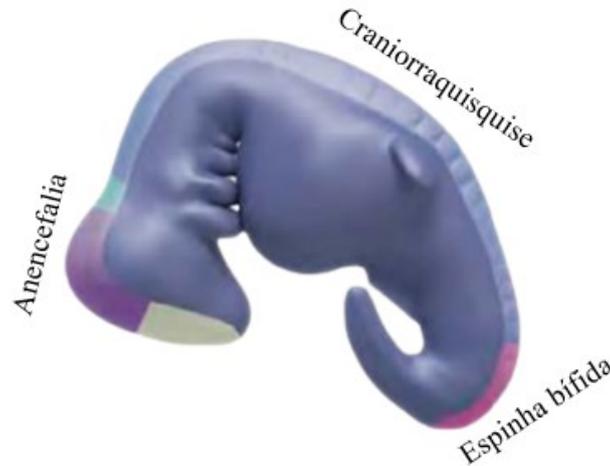
Figura 9. Visão geral de defeitos do tubo neural.



Fonte: Adaptado de COPP et al., 2015

Os DTNs refletem uma falha na neurulação, que pode ocorrer em vários pontos ao longo do tubo neural em fusão. A falha no fechamento das regiões anteriores do tubo neural resulta em anencefalia, enquanto a falha no fechamento das regiões posteriores do tubo neural resulta em espinha bífida, o DTN mais comum em humanos (Figura 10) (BOTTO et al., 1999; BOULET et al., 2008; ROSANO, 2000). O comprometimento neurológico abaixo da lesão leva à falta de sensibilidade, incapacidade de andar e incontinência. As condições associadas incluem hidrocefalia, que muitas vezes requer desvio do líquido cefalorraquidiano, deformidades vertebrais e distúrbios geniturinários e gastrointestinais (COPP; GREENE, 2010).

Figura 10. Defeito do tubo neural específico por região.

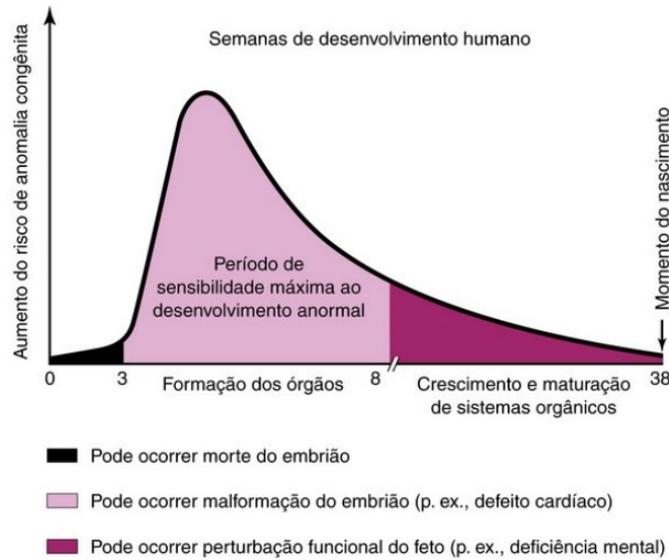


Fonte: Adaptado de WALLINGFORD et al., 2013

Os DTNs têm sido associados a fatores genéticos, como mutações genéticas simples e anomalias cromossômicas (PULIKKUNNEL; THOMAS, 2005) e fatores maternos como ingestão de folato, idade, etnia, obesidade e uso de medicamentos anticonvulsivantes (FREY; HAUSER, 2003). O aumento da ingestão de ácido fólico desde o período pré-concepcional pode ocasionar redução de 60-70% do risco de ocorrência de DTN (BLENCOWE et al., 2010; CZEIZEL; DUDÁS, 1992; DE-REGIL et al., 2010; LAURENCE et al., 1981).

A época mais sensível para ocorrência de malformação fetal é o período embrionário, entre a 3ª e a 8ª semanas (Figura 11). O período fetal começa no final da 8ª semana e se estende até o termo. Nesse intervalo, o risco de indução de defeitos estruturais diminui, mas os sistemas orgânicos ainda podem ser afetados. O cérebro, por exemplo, continua a se diferenciar durante o período fetal, de modo que exposições a agentes tóxicos podem causar déficits de aprendizagem ou déficits intelectuais. O fato de que a maioria dos defeitos congênitos ocorre antes da 8ª semana faz com que seja imperativo começar as estratégias de prevenção antes da concepção. Infelizmente, a maioria das mulheres só vai à primeira consulta pré-natal após a 8ª semana, ou seja, após o período crítico de prevenção da maioria dos defeitos congênitos (SADLER, 2016).

Figura 11. Período gestacional versus o risco de indução de defeitos congênitos.



Fonte: MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016

Os teratógenos agem de modo específico nas células e tecidos em desenvolvimento, desencadeando a embriogênese anormal (patogênese). Os mecanismos podem envolver inibição de um processo bioquímico ou molecular específico; a patogênese pode envolver morte celular, diminuição da proliferação celular ou outros fenômenos (SADLER, 2016). A tabela 1 traz alguns exemplos de teratógenos e as principais malformações congênitas a eles associadas.

Tabela 1. Teratógenos e malformações congênitas associadas.

TERATÓGENO	MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS
Agentes infecciosos	
Vírus da rubéola	Catarata, glaucoma, defeitos cardíacos, perda auditiva, anomalias nos dentes
Citomegalovírus	Microcefalia, comprometimento visual, retardo mental, morte fetal
Herpes-vírus simples (HSV)	Microftalmia, microcefalia, displasia da retina
Sífilis	Atraso intelectual, perda auditiva

Tabela 1. Teratógenos e malformações congênitas associadas (continua)

TERATÓGENO	MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS
Agentes físicos	
Raio X	Microcefalia, espinha bífida, fenda palatina, defeitos nos membros
Hipertermia	Anencefalia, espinha bífida, atraso intelectual
Agentes químicos	
Talidomida	Defeitos nos membros, malformações cardíacas
Aminopterina	Anencefalia, hidrocefalia, fendas labiais e palatina
Fenitoína	Síndrome da hidantoína fetal: defeitos faciais, atraso intelectual
Ácido valpróico	Defeitos do tubo neural; anomalias cardíacas, craniofaciais e nos membros
Trimetadiona	Fenda palatina, defeitos cardíacos, anomalias urogenitais e esqueléticas
Lítio	Malformações cardíacas
ISRS's	Malformações cardíacas, defeitos no tubo neural, atresia anal, fendas faciais e muitos outros defeitos
Opioides	Defeitos do tubo neural, cardiopatia, gastrosquise
Anfetaminas	Fendas labial e palatina, defeitos cardíacos
Varfarina	Anomalias esqueléticas
Inibidores da ECA	Retardo do crescimento, morte fetal
Álcool	SAF, fissuras palpebrais curtas, hiplasia maxilar, defeitos cardíacos, atraso intelectual

Tabela 1. Teratógenos e malformações congêntas associadas (conclusão).

TERATÓGENO	MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS
Agentes químicos	
Isotretinoína (vitamina A)	Olhos pequenos e com formato anormal, hipoplasia mandibular, fenda palatina, defeitos cardíacos
Hormônios	
Diabetes materna	Malformações diversas, defeitos cardíacos e do tubo neural
Obesidade materna	Defeitos do tubo neural, defeitos cardíacos, onfalocele

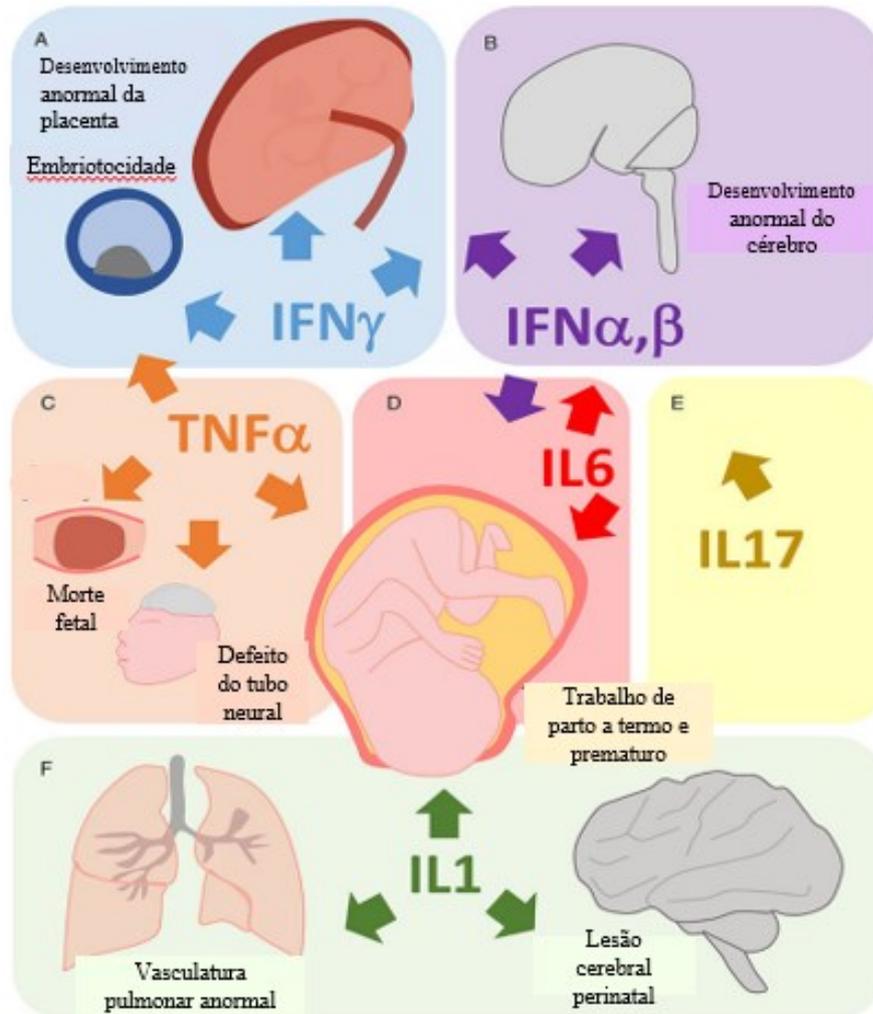
Legenda: ISRSs, inibidores seletivos da recaptção de serotonina; ECA, enzima conversora de angiotensina; SAF, síndrome alcoólica fetal; DES, dietilestilbestrol.

Fonte: Adaptado de SADLER, 2016

As células do sistema imune e as vias de sinalização das citocinas participam como mediadores da comunicação coordenada entre mãe e embrião/feto. A expressão exacerbada de IFN- γ , IFN- β , TNF- α , IL6, IL17 e IL-1 β pode ocasionar danos em múltiplos órgãos e sistemas. Ao mesmo tempo, certas infecções ou condições inflamatórias em gestantes causam doenças graves e têm impactos prejudiciais ao embrião/feto em desenvolvimento (Figura 12) (YOCKEY; IWASAKI, 2018). Citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) demonstraram inibir a migração trofoblástica através da elevação do inibidor do ativador do plasminogênio-1 em culturas de explantes vilosos do primeiro trimestre, causando invasão trofoblástica anormal (BAUER et al., 2004). O TNF- α também demonstrou regular negativamente a função endócrina dos trofoblastos, levando à falha na gestação (MONZÓN-BORDONABA; VADILLO-ORTEGA; FEINBERG, 2002).

A ativação de células imunológicas pró-inflamatórias desempenha um papel crítico na implantação de embriões, placentação e parto; no entanto, a desregulação dessas células pode levar a resultados prejudiciais à gestação, incluindo aborto espontâneo, restrição de crescimento fetal, doença materna, como distúrbios hipertensivos, ou problemas fetais e morte materna (CHATTERJEE et al., 2014).

Figura 12. Efeitos patológicos de citocinas na gestação.



Legenda: Expressão exacerbada de $IFN-\gamma$, $IFN-\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$, $IL-17$ e $IL-1\beta$ pode levar à falha no desenvolvimento em múltiplos sistemas orgânicos.

Fonte: Adaptado de YOCKEY; IWASAKI, 2018

Um estudo mostrou que em pessoas com trissomia do cromossomo 21, genes estimuladores de interferon são super expressados, provavelmente devido a uma cópia adicional de genes de receptores de interferon presentes no cromossomo 21 (SULLIVAN et al., 2016). Deficiência parcial de receptores de interferon alfa ($IFN-\alpha$) e interferon gama ($IFN-\gamma$) promoveu um aumento do crescimento da viabilidade neuronal em ratos com trissomia do 21, levantando a possibilidade de que algumas das complicações associadas à trissomia do 21, incluindo atraso no desenvolvimento e restrição de crescimento, possam ser mediadas por interferon (MAROUN; HEFFERNAN; HALLAM, 2000). Tomados em

conjunto, esses achados apontam para a sinalização hiperativa do interferon, como um potencial condutor de patologia cerebral e desenvolvimento anormal do cérebro após infecções congênitas e doenças genéticas (YOCKEY; IWASAKI, 2018).

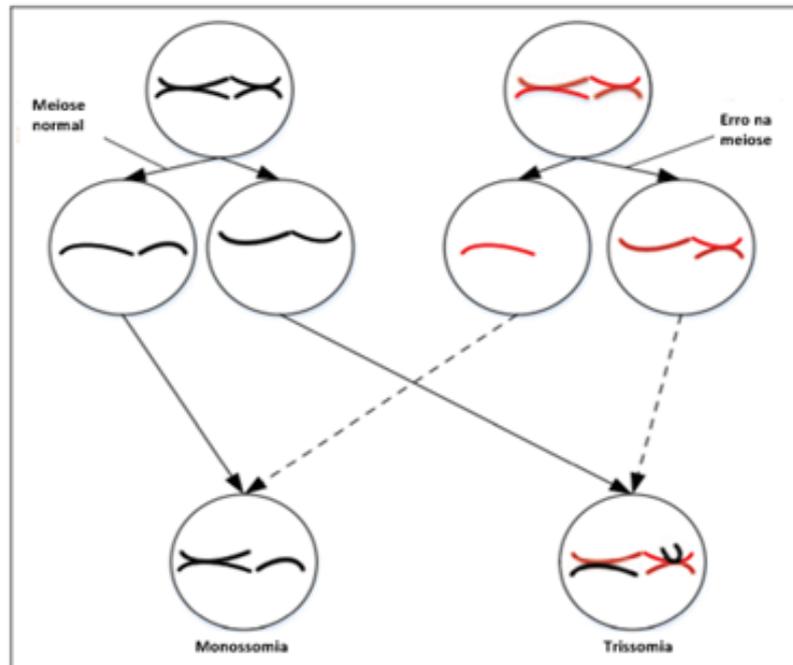
Muitos distúrbios congênitos resultam em estigma social e discriminação, o que pode levar a constrangimento, isolamento e outras reduções na interação com a comunidade. Essas condições também têm um alto custo econômico; a incapacidade de longo prazo cria um impacto significativo nos indivíduos, famílias, sistemas de saúde e sociedades. Esses efeitos são amplificados em países de baixa e média renda, onde a falta de acessibilidade e disponibilidade de serviços de apoio pode dificultar a convivência com uma deficiência. Alguns distúrbios congênitos podem ser evitados por meio de triagem, vacinação, fortificação de alimentos básicos (WHO, 2023).

2.6.1 Anormalidades Cromossômicas

As anomalias cromossômicas podem ser tanto numéricas quanto estruturais, e podem envolver um ou mais cromossomos autossômicos, cromossomos sexuais ou ambos simultaneamente (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

Dentre as anormalidades cromossômicas, as aneuploidias são as mais comuns em humanos. Caracterizam-se pela presença de um cromossomo extra ou um cromossomo ausente, causada por erros na segregação cromossômica em células euploides, incluindo segregação desigual de cromátides irmãs duplicadas na mitose ou meiose II ou cromossomos homólogos na meiose I (Figura 13). Um cariótipo aneuploide está sempre associado a anormalidades físicas ou mentais ou a ambas (CIMINI; DEGRASSI, 2005; LI; ZHU, 2022). As monossomias são mais deletérias que as trissomias. Monossomias completas geralmente não são viáveis, exceto para a monossomia do cromossomo X. As trissomias completas são viáveis para os cromossomos 13, 18, 21, X e Y (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Figura 13. Erro na divisão meiótica.

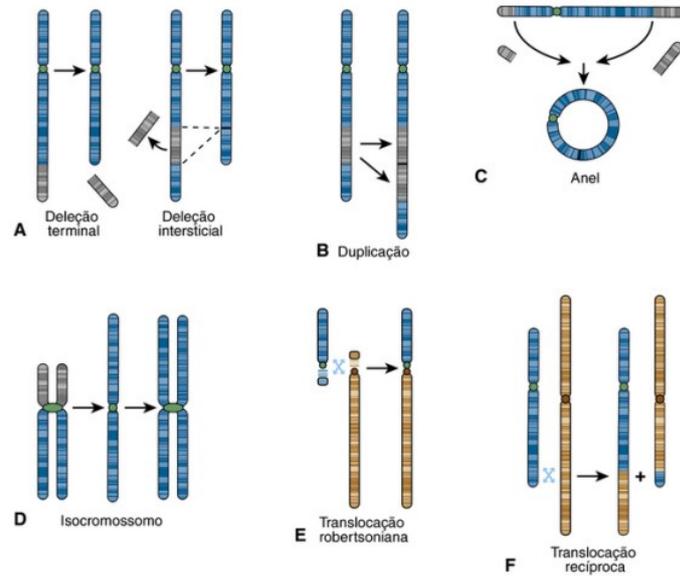


Legenda: Erro na segregação de cromossomos homólogos na meiose I

Fonte: Adaptado de HIXSON et al., 2015.

Anomalias estruturais (rearranjos envolvendo um ou mais cromossomos) também são relativamente comuns. Dependendo se o rearranjo cromossômico leva ou não a um desequilíbrio de conteúdo genômico, este pode ter ou não um efeito fenotípico. Os rearranjos estruturais resultam da quebra, recombinação ou troca cromossômica, seguida de reconstituição em uma combinação anormal (Figura 14). Enquanto os rearranjos podem ocorrer de várias maneiras, eles são, em conjunto, menos comuns que a aneuploidia; em geral, as anomalias cromossômicas estão presentes em um a cada 375 recém-nascidos. Como as alterações numéricas, os rearranjos estruturais podem estar presentes em todas as células de uma pessoa ou sob a forma de mosaico. Os rearranjos estruturais são classificados como balanceados, se o genoma possui o complemento normal de material cromossômico, ou desbalanceados, quando existe material adicional ou ausente (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

Figura 14. Rearranjos estruturais dos cromossomos.

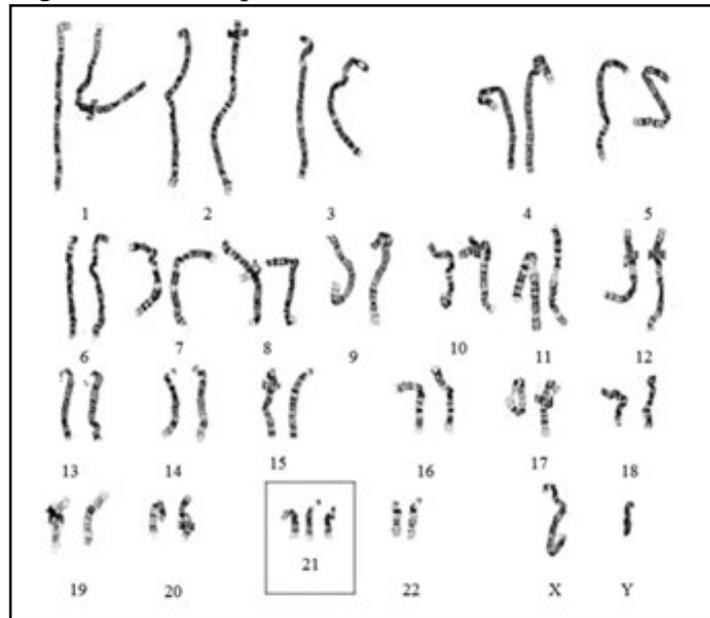


Legenda: A) Deleções terminal e intersticial, cada uma gerando um fragmento cromossômico acêntrico que é tipicamente perdido. B) Duplicação de um segmento cromossômico, levando à trissomia parcial. C) Cromossomo em anel com dois fragmentos acêntricos. D) Geração de um isocromossomo para o braço longo de um cromossomo. E) Translocação robertsoniana entre dois cromossomos acêntricos, frequentemente levando a um cromossomo pseudodicêntrico. F) Translocação entre dois cromossomos, com troca recíproca de segmentos translocados.

Fonte: NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016

Trissomia é a aneuploidia cromossômica na qual as células possuem um cariótipo que não é múltiplo do seu complemento haplóide (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). Aproximadamente 5% de todas as gestações são associadas com trissomias ou monossomias cromossômicas, a maioria das quais estão associadas com morte intrauterina, tornando a aneuploidia a principal causa de perda gestacional. Porém, algumas condições como a trissomia do cromossomo 21 (Figura 15) são compatíveis com a vida. Como as monossomias quase sempre resultam em abortos espontâneos, isto faz com que as trissomias sejam a principal causa de defeitos congênitos em humanos e a mais comum anormalidade cromossômica numérica (PANDEY; VERMA, 2021).

Figura 15. Cariótipo com trissomia do cromossomo 21.



Legenda: Imagem de cariótipo 47,XY,+21

Fonte: HIXSON et al., 2015

Dentre as trissomias dos cromossomos autossômicos, temos três síndromes que são as mais conhecidas, síndrome de Down (trissomia do 21), síndrome de Edwards (trissomia do 18) e síndrome de Patau (trissomia do 13) (ALBERMAN; MUTTON; MORRIS, 2012; SKRZYPEK; HUI, 2017).

As monossomias que envolvem cromossomos autossômicos são fatais, mas a monossomia do cromossomo X (síndrome de Turner) é compatível com a vida. Essa condição resulta, em geral (80%), da não disjunção durante a meiose dos cromossomos paternos e é caracterizada por infertilidade, estatura baixa, pescoço alado e outros defeitos (SADLER, 2016).

2.6.1.1 Trissomia do cromossomo 13 ou Síndrome de Patau

A síndrome de Patau, ocasionada pela presença de três cópias do cromossomo 13, clinicamente é caracterizada pela presença de defeitos cerebrais, anofalmia aparente, fenda palatina, fenda labial, pregas simiescas, polegares em gatilho, polidactilia e hemangioma capilar (PATAU et al., 1960). Devido à alta prevalência de holoprosencefalia na trissomia 13, o diagnóstico pré-natal dessa malformação deve sempre levantar a suspeita para a presença da

síndrome de Patau, especialmente quando outras anormalidades forem encontradas na ultrassonografia (CAREY, 2021).

A ocorrência da trissomia do 13 é de 1 em 10.000 a 20.000 nascidos vivos, com mortalidade pré-natal superior a 95% das gestações (NORIEGA; SIDDIK, 2023). É a terceira trissomia autossômica mais comuns com sobrevida após o nascimento (RASMUSSEN et al., 2003).

A idade materna avançada representa um risco de trissomia do 13 devido ao aumento da frequência de não disjunção na meiose, caracterizando a trissomia completa (WYLLIE et al., 1994). No entanto, 20% da síndrome de Patau pode resultar de uma translocação desequilibrada e raramente de mosaicismos (PETRY et al., 2013; WYLLIE et al., 1994). Uma translocação Robertsoniana desequilibrada resulta em duas cópias normais do cromossomo 13 e um braço longo adicional do cromossomo 13 (WYLLIE et al., 1994). Em torno de 5 – 10% dos casos de trissomia 13 são causados por translocação, sendo a mais comum a translocação Robertsoniana não balanceada 13;14 (ALBERMAN; MUTTON; MORRIS, 2012). Outra causa menos comum é o mosaicismos, que resulta em 3 cópias do cromossomo 13 em algumas células e duas cópias em outras. O mosaicismos é o resultado de um erro mitótico não disjuntivo e não está relacionado à idade materna (PETRY et al., 2013). O prognóstico é melhor em pacientes com mosaicismos e pacientes com translocações desequilibradas (PEROOS et al., 2012). A trissomia completa é a apresentação mais comum representando cerca de 80% de todos os pacientes (CAREY, 2021).

A sobrevida média é de 7 a 10 dias em pacientes nascidos vivos, e 90% vivem menos de 1 ano (PEROOS et al., 2012; WYLLIE et al., 1994). Há relatos de vários casos de sobrevida mais longa devido à terapia médica agressiva (PEROOS et al., 2012).

2.6.1.2 Trissomia do cromossomo 18 ou Síndrome de Edwards

A trissomia do 18 (Síndrome de Edwards) é uma anormalidade cromossômica associada com anomalias congênitas e que resulta em significantes complicações nos estágios da vida pré-natal e pós-natal. Essa trissomia é a segunda aneuploidia mais comum em nascidos vivos, seguinte a trissomia do 21 (GOEL et al., 2019; SPRINGETT et al., 2015). Apresenta alguns padrões característicos, como deficiência de crescimento pré-natal, alterações craniofaciais, postura distinta da mão com hipoplasia ungueal, hálux e esterno

curtos que permitem seu diagnóstico em recém-nascidos. Além dos aspectos externos, anomalias internas, particularmente envolvendo o coração, são muito comuns. O fenótipo da síndrome de Edwards geralmente resulta de três cópias do cromossomo 18. O mais exclusivo, contudo, é que em torno de 50% dos erros de não disjunção que acarretam nesta trissomia ocorrem na meiose II da oogênese. Diferindo assim das outras trissomias humanas, as quais geralmente mostram uma frequência maior de erros na meiose I materna (CAREY, 2021).

A trissomia do 18 é diagnosticada em 4,8 a cada 10.000 nascimentos e é mais comum no sexo feminino que masculino (SPRINGETT et al., 2015). Esta cromossomopatia está associada a alta taxa de mortalidade no primeiro ano de vida, em torno 75% a 95% (MEYER et al., 2016; ROOT; CAREY, 1994).

2.6.1.3 Trissomia do cromossomo 21 ou Síndrome de Down

A trissomia do 21 (Síndrome de Down) ocorre devido a não disjunção (segregação cromossômica anormal) ou por translocação, frequentemente causado por um erro durante a meiose. Além das características faciais reconhecíveis, retardo mental e baixa estatura, indivíduos com trissomia do 21 podem apresentar defeitos congênitos do coração, perda da audição, obstrução duodenal, propensão a desenvolver leucemia e defeitos no sistema imunológico. Na maioria dos indivíduos esta trissomia é o resultado da não disjunção, geralmente durante a primeira divisão meiótica materna. Atualmente é aceito que apenas 5% dos casos de síndrome de Down resultam de um erro na espermatogênese. Ocasionalmente, o cromossomo 21 extra é perdido por um subgrupo de células durante a clivagem. O embrião resultante se desenvolve como um mosaico de células normais e células com trissomia do 21. De 2% a 5% de todos os indivíduos com síndrome de Down são mosaicos. A trissomia do 21 nem sempre resulta de uma simples não disjunção, ela pode ser o resultado de uma translocação, onde uma cópia do cromossomo 21 em um gameta em desenvolvimento se prende à ponta de outro cromossomo, como o cromossomo 14, durante a primeira ou a segunda divisão da meiose (SCHOENWOLF et al., 2016).

Estima-se que no Brasil, 1 em cada 700 nascimentos ocorre o caso de trissomia 21, que totaliza em torno de 300 mil pessoas com Síndrome de Down. No mundo, a incidência estimada é de 1 em 1 mil nascidos vivos. A cada ano, cerca de 3 a 5 mil crianças nascem com síndrome de Down, sendo a aneuploidia mais comum em nascidos vivos (FBASD, 2023).

A trissomia do 21 livre ou simples está presente em 95% dos indivíduos com Síndrome de Down e são resultado de um erro na meiose I materna (~66%) ou na meiose II (~21%); meiose I paterna (~3%) ou meiose II (5%); ou mitose, após a formação do zigoto (5%) (ANTONARAKIS, 1991; ANTONARAKIS et al., 1993; HASSOLD; HUNT, 2001). A trissomia do 21 resultante de translocação ocorre em torno de 5% dos indivíduos afetados, comumente t(14;21) ou t(21;21) (ANTONARAKIS, 1998; MORRIS et al., 2012). A trissomia parcial do 21 é rara (BARLOW et al., 2001; LYLE et al., 2009) e está associada com uma série de sintomas que variam de acordo com o tamanho da triplicação parcial do cromossomo 21.

A idade materna é um fator relevante para ocorrência de trissomias. Contudo, não está claro se as mulheres mais velhas produzem mais ovócitos com não disjunção do cromossomo 21 ou se a eficiência do aborto espontâneo de embriões com trissomia do 21 diminui com a idade (SCHOENWOLF et al., 2016).

2.6.1.4 Monossomia do X ou Síndrome de Turner

Síndrome de Turner é uma condição rara caracterizada por hipogonadismo hipergonadotrófico feminino, infertilidade, baixa estatura, desordens endócrinas e metabólicas, elevado risco para doenças autoimunes, bem como outras condições médicas como doenças cardiovasculares (GRAVHOLT et al., 2019).

Indivíduos com síndrome de Turner podem apresentar diferentes cariótipos, todos eles com ausência do segundo cromossomo sexual, que levam ao desenvolvimento das características clínicas da síndrome. Os cariótipos incluem 45,X (perda completa de um cromossomo X), bem como seus mosaicos (por exemplo, 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX), a presença de um isocromossomo do braço p ou q, cromossomo em anel, a presença de material cromossômico Y e outros cariótipos mais complexos. Em torno de 40 – 50% das mulheres com síndrome de Turner apresentam cariótipo 45,X (EL-MANSOURY et al., 2007; GRAVHOLT et al., 2019); mosaicismo com 45,X/45,XX ocorre em 15 – 25%, isocromossomo está presente em 20% das mulheres e cromossomo X em anel está presente em poucas mulheres. Em adição, 10 - 20% das mulheres têm diferentes quantidades de material do cromossomos Y, dessas mulheres, 3% apresentam cariótipo 45,X/46,XY (CAMERON- PIMBLETT et al., 2017; GRAVHOLT et al., 2019).

2.7 ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL DURANTE A GESTAÇÃO

2.7.1 Marcadores Bioquímicos do Período Gestacional

No primeiro e segundo trimestres, marcadores bioquímicos produzidos pela unidade fetoplacentária podem ser quantificados para avaliar os riscos de anomalias fetais. Dentre eles, HCG, PAPP-A e inibina-A sintetizados pela placenta; AFP sintetizada no fígado fetal; estriol não conjugado, uma proteína sintetizada pela placenta a partir de andrógenos adrenais fetais (CHASEN, 2014).

Durante a gestação, o rastreio combinado utilizando marcadores bioquímicos do sangue materno, marcadores ultrassonográficos e a idade materna são importantes para calcular o risco de anomalias cromossômicas (ROSE; MENNUTI, 1993).

2.7.1.1 *Gonadotrofina coriônica humana (HCG)*

Na gestação normal as moléculas intactas de HCG começam a ser detectadas no sangue materno 2 a 3 semanas após a concepção. Sua concentração aumenta exponencialmente no primeiro trimestre, dobrando a cada dois dias e alcança as maiores concentrações entre a 11^a-13^a semana. No segundo trimestre, diminui em 80% até a 20^a semana e permanece nesta concentração até o termo. Tanto concentrações elevadas como diminuídas de HCG intacta têm sido associadas a alterações maternas ou feto-placentárias, tornando-se, sua quantificação, método investigativo para identificação de pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino (RCIU) e trissomias (BANERJEE et al., 2005; MULLER et al., 1996).

Como anormalidades trofoblásticas têm papel central na fisiopatologia da pre-eclâmpsia, tem sido encontrada produção aumentada de HCG nesta condição e acredita-se que seja uma resposta benéfica à hipóxia trofoblástica, favorecendo a angiogênese, vasodilatação e invasão trofoblástica (KHARFI et al., 2005). Estudos clínicos mostram elevação consistente das concentrações de HCG de acordo com a gravidade da pré-eclâmpsia (GURBUZ et al., 2004); sugerindo seu uso como potencial marcador indicativo desta condição no segundo trimestre (ROIZ-HERNÁNDEZ; CABELLO-MARTÍNEZ; FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2006).

Nos casos de fetos com trissomia do 21, as concentrações de HCG estão particularmente aumentadas entre a 11^a e a 14^a semana (SPENCER et al., 2002). Na trissomia

do 13 as concentrações de HCG também estão aumentadas, porém, estão diminuídas na trissomia do 18 (BANERJEE et al., 2005).

2.7.1.2 Proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A)

A PAPP-A é uma metaloproteinase derivada do sinciciotrofoblasto e é detectável na circulação materna desde o início da gestação. A PAPP-A é responsável pela clivagem da proteína-4 de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-4), consequentemente, contribui para a regulação do crescimento fetal (BOLDT; CONOVER, 2007; CONOVER, 2012; RANDHAWA; COHEN, 2005).

Juntamente com HCG sérico livre e a TN fetal, o PAPP-A constitui uma parte da triagem combinada do primeiro trimestre para a trissomia do 21. A triagem no primeiro trimestre é um método de triagem eficaz com uma taxa de detecção de aproximadamente 85% e uma taxa de falso-positivo de 5%. Embora o benefício da triagem no primeiro trimestre para triagem cromossômica seja indiscutível, os esforços para identificar biomarcadores para triagem de outros desfechos adversos da gestação continuam. Vários estudos investigaram técnicas e biomarcadores com o objetivo de prever resultados adversos da gestação durante o primeiro trimestre (HALSCOTT; RAMSEY; REDDY, 2014).

O PAPP-A foi estudado como um marcador independente de desfechos adversos da gestação; estudos anteriores sugeriram que os riscos de aneuploidia e complicações na gestação, incluindo distúrbios hipertensivos, aborto espontâneo, fetos com tamanho reduzido para idade gestacional, parto prematuro e natimortos, aumentam com a diminuição das concentrações de PAPP-A (BARRETT; BOWER; HADLOW, 2008; D'ANTONIO et al., 2013; RANTA et al., 2011; SPENCER; COWANS; NICOLAIDES, 2008). No entanto, o valor de PAPP-A como um marcador individual é debatido e diferentes valores de corte para concentrações baixas de PAPP-A foram investigadas em estudos anteriores (BRAMELD et al., 2008; LONCAR; VARJACIC; ARSENIJEVIC, 2013; MARTTALA et al., 2010; PATIL; PANCHANADIKAR; WAGH, 2014).

2.7.1.3 Inibina A

Inibinas são glicoproteínas da família do fator de transformação do crescimento (TGF β), produzidas por diversos tipos celulares em vários tecidos e órgãos, com destaque para os ovários, testículos e placenta. A inibina A tem como fontes principais o corpo lúteo e a placenta e, portanto, sua utilidade diagnóstica está ligada às diversas disfunções placentárias, como as associadas a abortamento precoce, cromossomopatias e pré-eclâmpsia (TSIGKOU et al., 2008).

Atua na retroalimentação negativa na secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) hipofisário. A inibina A é a forma molecular predominante na circulação materna a partir da 4^a semana de gestação (MUTTUKRISHNA, 2004). Suas concentrações estão elevadas no segundo trimestre gestacional, nos casos da presença de fetos com trissomia do 21 (CUCKLE; HOLDING; JONES, 1994; SPENCER; WOOD; ANTHONY, 1993; VAN LITH et al., 1992). Porém, as concentrações não se elevam no primeiro trimestre na presença desta aneuploidia, sendo a dosagem deste marcador indicada apenas no segundo trimestre (VAN LITH; MANTINGH; PRATT, 1994; WALLACE et al., 1994).

2.7.1.4 Alfafetoproteína (AFP)

A AFP, inicialmente descrita como uma proteína fetal por Bergstrand e Czar em 1956, é sintetizada inicialmente pela vesícula umbilical embrionária, depois pelo trato gastrointestinal e, finalmente, pelo fígado fetal (MURRAY; NICHOLSON, 2011; NEWBY et al., 2005). A síntese de AFP aumenta até a 20^a semana de gestação e então se mantém constante até a 32^a semana, quando começa a decair até o nascimento (MIZEJEWSKI, 2004). No feto, a concentração de AFP atinge o pico sérico ao final do primeiro trimestre, declinando exponencialmente entre 14^a e 32^a semanas de gestação, devido à expansão do volume sanguíneo e a diminuição da sua síntese (BANNISTER, 2006).

No início da gestação, a AFP é introduzida do organismo fetal para o LQAM por meio da pele e mais tarde, excretada pelos rins (NEWBY et al., 2005). A concentração máxima de AFP no LQAM (aproximadamente 80 $\mu\text{g/mL}$) é atingida com 10 semanas de gestação (BLOHM et al., 1998) e essa concentração decai gradualmente até o dia do parto. As concentrações de AFP no LQAM decaem em torno de 10% por semana entre 14 e 20 semanas

de gestação (CRANDALL et al., 1983) e alcançam 1% no soro fetal no segundo trimestre da gestação (NEWBY et al., 2005).

A AFP penetra na corrente sanguínea da mãe a partir do LQAM por meio do saco amniótico e da decídua por um transporte baseado em gradiente hidrostático altamente eficiente e, em menor extensão, pelo transporte extracelular (MIZEJEWSKI, 2003). Foi demonstrado que a placenta embora possua receptores para AFP, ela não produz esta proteína (NEWBY et al., 2005).

Numa fisiologia normal, a AFP se reduz rapidamente após o nascimento e se mantém em concentrações baixas ao longo de toda a vida. Um estudo realizado no final de 1980 concluiu que o tamanho absoluto do feto, bem como a idade gestacional podem desempenhar um papel significativo na determinação materna e fetal das concentrações de AFP (OBIEKWE et al., 1985). Da mesma forma, concentrações baixas de AFP no soro materno durante o segundo trimestre foram posteriormente associadas a um risco muito baixo de parto prematuro, pré-eclâmpsia e complicações placentárias, e vice-versa (KIMWALLER et al., 1996). As concentrações reduzidas de AFP em LQAM e soro materno podem identificar as gestações com síndrome de Turner que apresentam maior risco de morte fetal (ALVAREZ-NAVA et al., 2015). Diferentes condições fetais podem resultar em elevadas concentrações de AFP, tais como, defeitos de fechamento do tubo neural (anencefalia, espinha bífida e encefalocele) e nas situações em que ocorre a passagem de proteínas plasmáticas fetais para o LQAM por meio da pele (hidropsia fetal, defeitos da parede abdominal e cistos), digestão alterada da AFP (atresia esofágica, duodenal ou intestinal) (BANNISTER, 2006; MAESTRI et al., 1998; PALOMAKI et al., 1988).

No sangue materno, a AFP é detectada a partir de seis semanas de gestação e suas concentrações aumentam gradualmente, alcançando 50 ng/mL no segundo trimestre (NEWBY et al., 2005). A concentração máxima (aproximadamente 1000 ng/mL) é observada com 32 semanas de gestação e posteriormente a concentração diminui até o dia do parto, atingindo aproximadamente 50 – 100 ng/mL (MIZEJEWSKI, 2003; NEWBY et al., 2005).

Concentrações séricas materna mais baixas de AFP são observados quando há presença de distúrbios cromossômicos fetais e isso pode ser resultante de função renal e hepática fetal prejudicadas, bem como pelo transporte placentário prejudicado, em vez de uma produção reduzida de AFP fetal (VAN LITH et al., 1991). Defeitos no transporte placentário foram observados em casos de síndrome de Down e por isso, foram observadas concentrações

menores de AFP no sangue materno, apesar da produção fetal ser normal. Essa teoria é ainda confirmada pela determinação histopatológica de altas concentrações de AFP na placenta (NEWBY et al., 1996, 2005).

Em casos de acrania e mielomeningocele aberta, a AFP extravasa do líquido cefalorraquidiano para o LQAM e na sequência é absorvida pela corrente sanguínea materna. Tal condição não ocorre em casos de defeitos do tubo neural do tipo fechado (ADINOLFI; ADINOLFI; LESSOF, 1975; KRANTZ; HALLAHAN; CARMICHAEL, 2016). Um achado significativo é que concentrações elevadas de AFP não são observadas no primeiro trimestre gestacional, mas apenas durante o segundo trimestre em casos de mielomeningocele do tipo aberta. O aumento das concentrações de AFP no LQAM também pode estar relacionado a casos de defeitos da parede abdominal (onfalocele, gastrosquise) (SPENCER et al., 2014).

A deficiência de AFP também ocorre como defeito congênito, na qual uma mutação genética causa a completa inibição da produção desta proteína. Contudo, a AFP não é necessária para o desenvolvimento normal do feto, porque na ausência desta glicoproteína, suas funções são realizadas pela albumina e alfa-albuminas (PETIT et al., 2009; SHARONY et al., 2003).

2.7.1.5 Estriol

O estriol é produzido pela placenta pela conversão de sulfato de 16-hidroxi-deidroepiandrosterona em andrógenos, que são posteriormente aromatizados em estriol. Detectado inicialmente com 9 semanas e atinge seu pico entre 31-35 semanas de gestação. No início da gestação, a produção de deidroepiandrosterona pela glândula adrenal fetal é independente da produção do hormônio adrenocorticotrófico hipofisário. No segundo trimestre, entretanto, o hormônio adrenocorticotrófico é necessário para a função adrenal. A partir de então, 90% da produção de estriol ocorre pela deidroepiandrosterona derivada da glândula adrenal fetal (SIITERI; MACDONALD, 1966).

Concentrações baixas de estriol não conjugado foram associadas a uma série de resultados adversos na gestação, como hipertensão, aborto espontâneo, restrição do crescimento fetal e morte fetal (ILAGAN et al., 2004; KOWALCZYK, 1998; SCHLEIFER et al., 1995; YARON et al., 1999). O estriol não conjugado sérico materno é usado na triagem tripla para síndrome de Down (WALD et al., 1988).

Além dos marcadores para triagem de anormalidades fetais já citados, trabalhos encontrados na literatura indicam que alguns marcadores bioquímicos, tais como, VB12, FOL e HOMO, se encontram alterados em gestantes com pré-eclâmpsia (MAKEDOS et al., 2007; PISAL et al., 2019) e em alguns casos estão correlacionados com defeitos congênitos (ELIZABETH et al., 2017; IACOBAZZI et al., 2014).

2.7.1.6 Vitamina B12 (VB12)

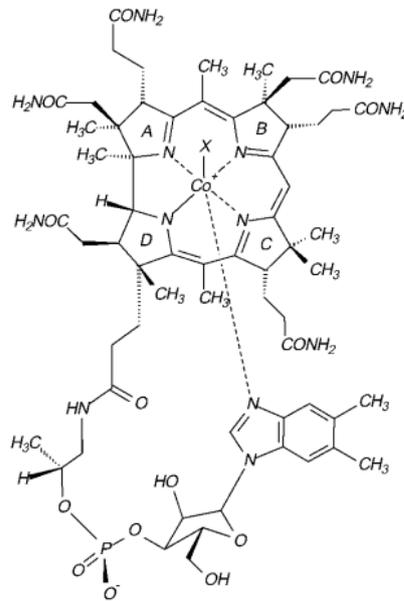
A vitamina B12 (VB12), também conhecida como cobalamina, é sintetizada exclusivamente por microrganismos e obtida da dieta pelo consumo de alimentos de origem animal, incluindo carnes e laticínios (MARTENS, 2002; O'LEARY; SAMMAN, 2010; TARANTO et al., 2003; WATANABE, 2007). Portanto, vegetarianos, veganos e populações de países subdesenvolvidos são os grupos de pessoas apresentam risco aumentado de deficiência desta vitamina (GREEN et al., 2017; PAWLAK; LESTER; BABATUNDE, 2014).

Ela possui uma estrutura química complexa (Figura 16), formada por um átomo de cobalto que se encontra situado dentro de um anel corrina formando um anel tetrapirrólico de fórmula molecular $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ e com um peso molecular de 1,355 kDa (HODGKIN et al., 1956).

O transporte de VB12 nos fluidos corporais extracelulares é dependente de três proteínas transportadoras: haptocorrina (conhecida como proteína R ou transcobalamina I); transcobalamina (conhecida como transcobalamina II) e fator intrínseco. Essas proteínas compartilham a mesma estrutura básica e cada qual carrega uma única molécula de VB12. Uma vez ingerida, ela se liga à haptocorrina, produzida pelas glândulas salivares, que a protege do meio ácido estomacal. No estômago, pela ação do ácido clorídrico e da pepsina a VB12 é liberada e segue para o intestino, onde se liga ao fator intrínseco. O complexo VB12/fator intrínseco se liga ao receptor de cubilina no íleo distal, no qual ocorre a endocitose da vitamina (NIELSEN et al., 2012). Uma vez absorvida, ela é liberada no plasma onde se liga a proteínas transportadoras, haptocorrina e transcobalamina (Figura 17) (STABLER, 2013). Na circulação, 20-25% da VB12 está ligada a transcobalamina (chamada holo-transcobalamina ou B12 ativa), a qual é absorvida pelas células. Os outros 75-80%

ligados a haptocorrina são estocados no fígado (NEXO; HOFFMANN-LÜCKE, 2011; STABLER, 2013).

Figura 16. Estrutura química da vitamina B12.



Fonte: Adaptado de MARTENS, 2002.

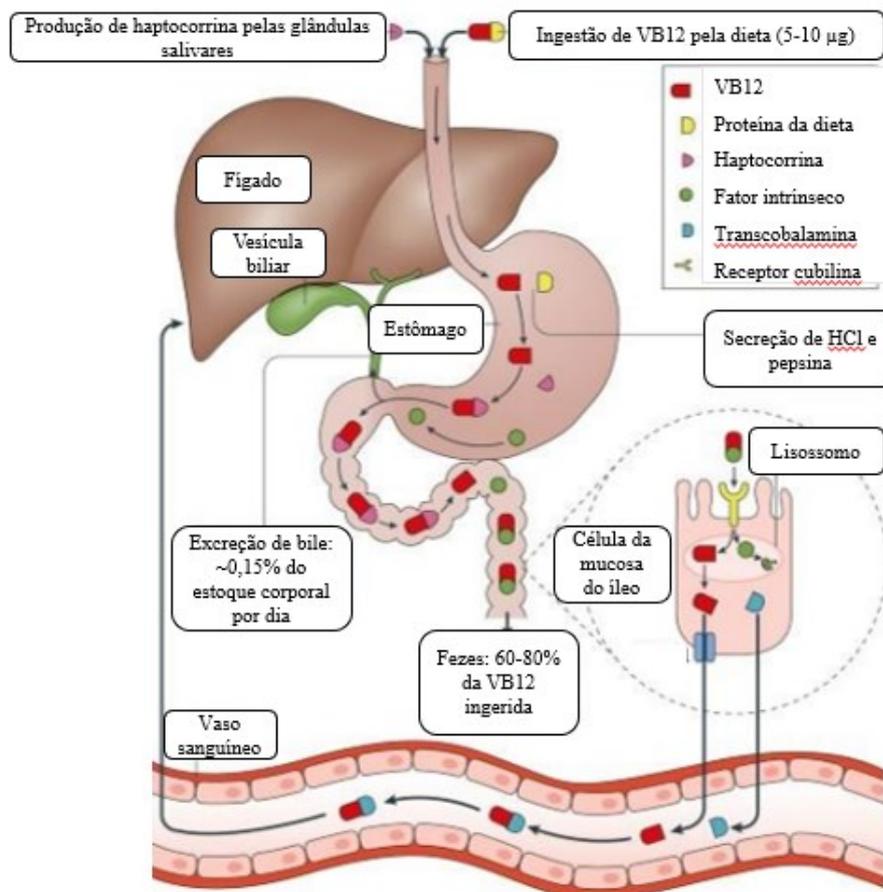
Ela desempenha papel fundamental na síntese do DNA, na eritropoiese, na síntese de nucleoproteínas e mielina, na replicação celular e no crescimento normal (SIDDQUA, 2014; KIBIRIGE; MWEBAZE, 2013; RAINA et al., 2014). Atua como cofator em três importantes reações no organismo: conversão do ácido metilmalônico em succinil coenzima A (succinil-CoA); conversão de homocisteína em metionina e conversão de 5-metiltetrahydrofolato em tetrahydrofolato (LANGAN; GOODBRED, 2017; STABLER, 2013). A reação que envolve o FOL é essencial para uma série de reações de transferência de metila, estando indiretamente envolvida na síntese de nucleotídeos (THAKKAR; BILLA, 2015).

Existe um consenso que as concentrações de VB12 > 250 pmol/L, em mulheres desde o início da gestação, estão associadas ao baixo risco de ocorrência de DTN em comparação quando as concentrações estão abaixo desse valor (MOLLOY, 2018). Assim, em mulheres bem nutridas, a gestação drena relativamente pouco os estoques maternos de VB12, e é raro ver um aumento na incidência de anemia megaloblástica devido à deficiência dessa vitamina durante a gestação. Por outro lado, a baixa ingestão deste micronutriente durante a

gestação pode causar danos ao feto, dado seu papel fundamental na mielinização neural, no desenvolvimento cerebral e no crescimento (ALLEN, 1994). No entanto, os mecanismos subjacentes responsáveis por isso são desconhecidos (FINKELSTEIN; LAYDEN; STOVER, 2015).

As concentrações plasmáticas totais de VB12 caem de forma constante ao longo da gestação, começando no primeiro trimestre (FERNANDES-COSTA; METZ, 1982; MILMAN et al., 2006).

Figura 17. Absorção e circulação entero-hepática da vitamina B12.



Legenda: As proteínas transportadoras: haptocorrina, transcobalamina e fator intrínseco estão envolvidas no transporte e absorção da Vitamina B12. Após ingestão de alimentos ricos em proteínas, a VB12 é liberada destas proteínas por proteólise, onde se liga à haptocorrina no estômago. A degradação da haptocorrina bem como a alteração do pH no duodeno permitem a ligação da vitamina ao fator intrínseco, produzido pelas células parietais. O complexo VB12-fator intrínseco liga-se ao receptor cubilina o qual medeia a captação nos enterócitos do íleo distal. Após a liberação pelo lisossomo, a VB12 é liberada através da membrana basolateral do enterócito pela proteína de resistência à múltiplas drogas 1 (MDR1) e se liga à transcobalamina. Maior parte da VB12 é armazenada no fígado e parte é excretada na bile sofrendo circulação entero-hepática.

Fonte: Adaptado de BUTOLA et al., 2020

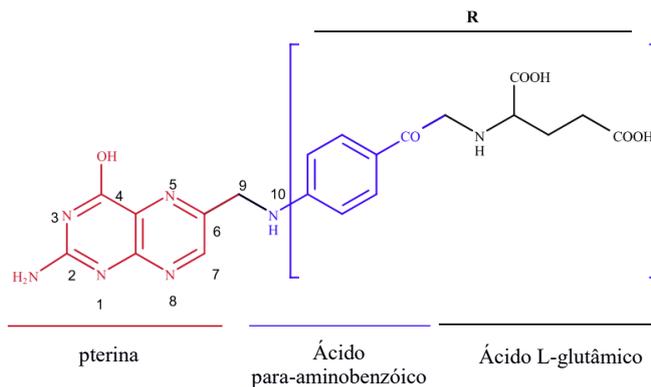
Pouco se sabe sobre a via de transporte de VB12 da mãe para o feto, mas ambas as proteínas transportadoras desta vitamina são produzidas pela placenta e se ligam à VB12 promovendo transporte ativo e a subsequente transferência para o feto. Além disso, a placenta pode regular a absorção fetal de VB12 ajustando sua taxa de síntese de transcobalamina (MILLER et al., 1993; PEREZ-D’GREGORIO; MILLER, 1998; SCHNEIDER; MILLER, 2010). A síntese prejudicada de transcobalamina também pode levar à deficiência de VB12 no recém-nascido (SCHNEIDER; MILLER, 2010).

2.7.1.7 Folato (FOL)

O folato (FOL) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (vitamina B9) encontrado em alimentos como vegetais de folhas verdes, legumes, gema de ovo, fígado e frutas cítricas. Contudo, o FOL é altamente suscetível à oxidação, congelamento, aquecimento e cocção prolongada, podendo ter perdas de até 95% nesses processos (SCHOLL; JOHNSON, 2000; WILSON et al., 2007).

A estrutura básica do folato compreende um anel de pteridina ligado a ácido p-aminobenzóico por meio de um grupo metileno, um resíduo de ácido L-glutâmico está ligado ao ácido p-aminobenzóico (Figura 18) (NADERI; HOUSE, 2018).

Figura 18. Estrutura química do folato.



Fonte: Adaptado de NADERI; HOUSE, 2018.

O ácido fólico é a forma sintética e mais estável de FOL, por isso, é a apresentação mais utilizada em suplementos e fortificação alimentar, com biodisponibilidade de 10 a 98%

superior à dos folatos naturalmente contidos nos alimentos (DE-REGIL et al., 2010; MCNULTY; PENTIEVA, 2004; YANG et al., 2010).

Nem o FOL nem o ácido fólico são metabolicamente ativos. Ambos devem ser reduzidos para participar do metabolismo celular. Após a ingestão e absorção, o ácido fólico é convertido em di-hidrofolato (DHF) e posteriormente em tetra-hidrofolato (THF). Deste modo, o ácido fólico necessita de uma série de processos enzimáticos para se transformar na forma ativa do FOL, chamada de 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF), também conhecido como L-metilfolato (PIETRZIK; BAILEY; SHANE, 2010).

O 5-MTHF é a forma fisiologicamente ativa de FOL que serve como cofator para reações enzimáticas que envolvem a transferência de porções de um carbono necessárias para a síntese de purina e pirimidina. O 5-MTHF circulante pode ser transportado para dentro das células pelo transportador reduzido de FOL, um transportador facilitador de troca aniônica ou por um dos dois receptores de FOL, receptor α e β (BEAUDIN; STOVER, 2009).

O FOL é um nutriente essencial que desempenha um importante papel no metabolismo dos ácidos nucléicos, no crescimento celular, e é importante para o crescimento fetal. Atua como cofator em processos epigenéticos como metilação do DNA, a qual modula a expressão de genes, influenciando desse modo a proliferação celular e apoptose durante o desenvolvimento fetal (FALL et al., 2009). A deficiência de FOL nos tecidos pode resultar na síntese ineficiente de DNA, gerando uma diminuição na proliferação celular. Essa deficiência pode estar associada a anemias, neuropatias periféricas nas mães durante o período gestacional e afetar o feto em formação, que pode apresentar anomalias congênitas, como os defeitos de fechamento do tubo neural (KIM; FRISO; CHOI, 2009; RIEDER, 1994). Estudos observacionais sugerem que concentrações reduzidas de FOL na circulação materna estão associadas com aumento no risco de nascimento prematuro, descolamento da placenta, RCIU e pré-eclâmpsia (CZEIZEL et al., 2010; LINDBLAD et al., 2005).

A suplementação com FOL no período periconcepcional pode prevenir a ocorrência de DTN (CZEIZEL; DUDÁS, 1992; DE WALS et al., 2007; PITKIN, 2007; RIEDER, 1994). Esta descoberta levou à fortificação de grãos de cereais com ácido fólico nos Estados Unidos, Canadá e outros países (PITKIN, 2007). A fortificação tem sido associada à diminuição significativa da prevalência de DTNs (DE WALS et al., 2007; HONEIN, 2001; RAY et al., 2002) e reduções menores na prevalência de outros defeitos congênitos, incluindo transposição das grandes artérias, fenda palatina, estenose pilórica, defeitos de redução dos

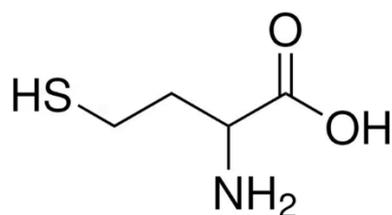
membros superiores e onfalocele (CANFIELD et al., 2005). O mecanismo pelo qual a deficiência de FOL afeta o fechamento do tubo neural permanece desconhecido, embora a elevação das concentrações de homocisteína e o comprometimento da transmetilação dependente de S-adenosilmetionina (SAM) possam estar implicados (BLOM, 2009; FELKNER et al., 2009).

A insuficiência de FOL pode acarretar efeitos genotóxicos (MACFARLANE et al., 2015). O 5,10-metil-THF é a principal fonte de grupos metil necessários para a síntese de deoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de deoxiuridina monofosfato (dUMP). Em condições em que há deficiência de FOL, ocorre acúmulo de dUMP e como resultado, a base nitrogenada uracila é incorporada no DNA, em vez de timina, e o processo de reparo para remover a uracila erroneamente incorporada, frequentemente sofre falhas. Fortes evidências sugerem que a excessiva incorporação de uracila no DNA além de conduzir a ponto de mutação, também pode resultar na geração de quebras em fita simples e dupla do DNA, quebras cromossômicas e formação de micronúcleos (BLOUNT et al., 1997; BLOUNT; AMES, 1995; BOLUFER et al., 2006).

2.7.1.8 Homocisteína (HOMO)

A homocisteína (ácido 2-amino-4-mercapto butírico) (HOMO) (Figura 19) é um aminoácido sulfurado que não está presente na dieta e não é utilizado na síntese proteica, mas é produzido nas células a partir da desmetilação do aminoácido metionina (SELHUB, 1999).

Figura 19. Estrutura química da homocisteína.

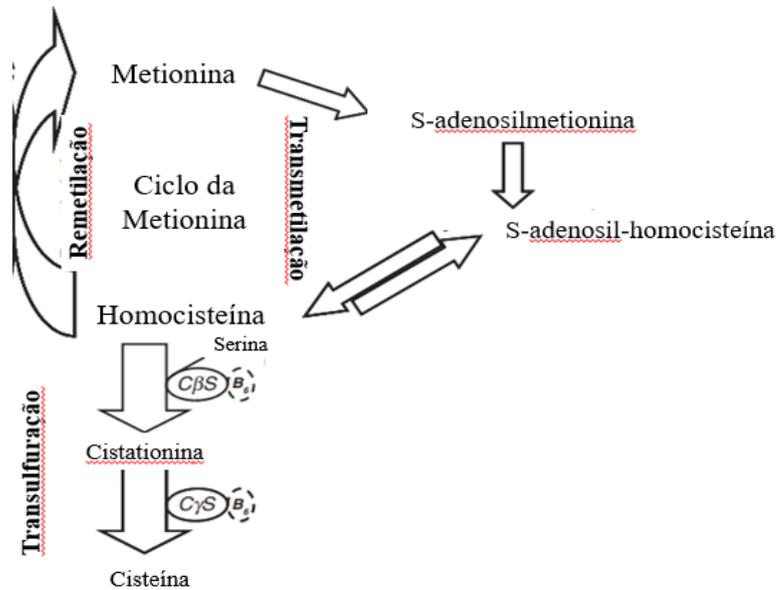


Fonte: FINKELSTEIN; MARTIN, 2000

Posteriormente, a HOMO pode ser convertida de forma reversível em outros metabólitos que participam de reações celulares, ou pode ser convertida irreversivelmente a

cisteína e ser eliminada do organismo, o que ocorre por meio de três vias metabólicas principais: a remetilção, a transmetilação e a transulfuração (Figura 20) (HAGUE, 2003; MEDINA MA; URDIALES JL; AMORES-SANCHES MI, 2001).

Figura 20. Metabolismo da homocisteína.



Fonte: Adaptado de MURPHY; FERNANDEZ-BALLART, 2011

A hiperhomocisteinemia tem sido associada à deficiência de FOL e VB12, além de complicações gestacionais, como DTNs, pré-eclampsia, RCIU e parto prematuro, bem como distúrbios mentais, dano cognitivo em idosos, psoríase e alguns tumores (COTTER et al., 2001; MILLS et al., 1995; ONALAN et al., 2006; REFSUM, 2001; REFSUM et al., 1998; RONNENBERG et al., 2002). Além disso, está associada com redução da metilação, disfunção endotelial e aumento no dano ao DNA (DEKKER et al., 1995; FENECH; AITKEN; RINALDI, 1998; GUERRA-SHINOHARA et al., 2002; SMITH, 2008; VOLLSET et al., 2000). Evidências sugerem que o excesso de HOMO exerce efeitos patológicos por meio do dano oxidativo e apoptose (FORGES et al., 2007; KARK et al., 1999; ROBERTS; REDMAN, 1993). É plausível que esses eventos metabólicos contribuam para disfunção vascular da placenta e do endotélio materno, os quais estão associados com resultados adversos da gestação (HAGUE, 2003).

Efeitos sobre o feto são dependentes da transferência de nutrientes da mãe e das concentrações de vitaminas e HOMO maternas no período pré-concepcional (ELIZABETH et al., 2017). Concentrações elevadas de HOMO no LQAM também estão associadas com DTN e defeitos cardíacos congênitos (STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1995; WENSTROM et al., 2001).

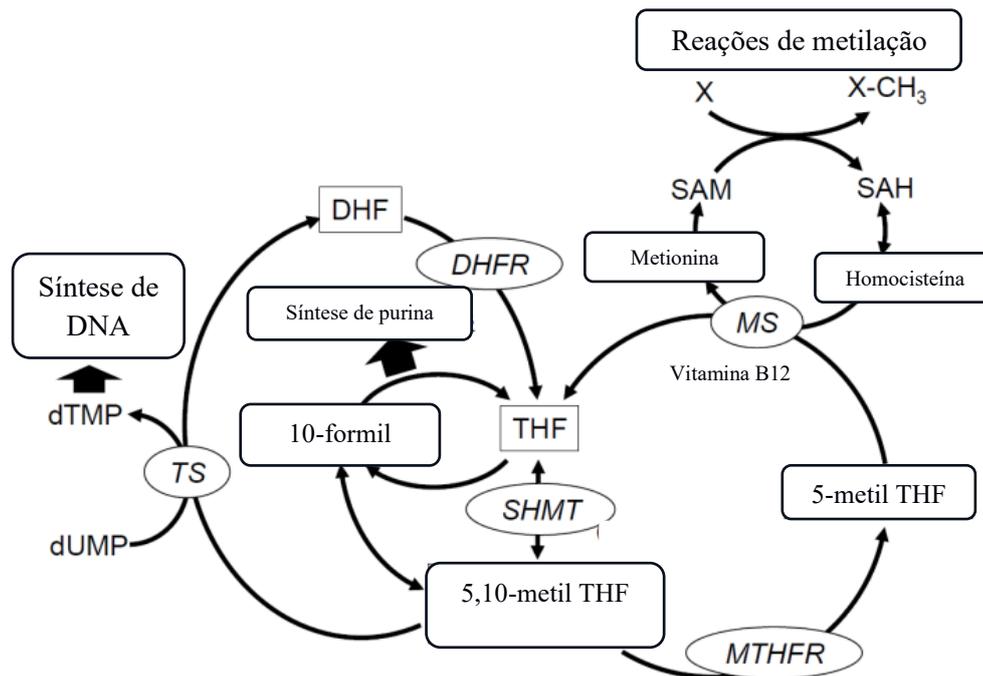
2.7.2 Inter-relação entre Folato, Vitamina B12 e Homocisteína

A HOMO é formada a partir da metionina como produto de numerosas reações de transmetilação dependentes de S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 20 e 21). A HOMO assim formada é direcionada para a via de transulfuração que converte irreversivelmente HOMO em cisteína. Alternativamente, é remetilada em metionina, uma reação que na maioria tecidos é catalisado pela metionina sintase (MS). Esta enzima usa VB12 como cofator e metiltetrahidrofolato (metil-THF) como substrato (FINKELSTEIN, 1990), e isto explica a estreita relação entre FOL, VB12 e HOMO. A deficiência de qualquer uma das vitaminas leva ao aumento da HOMO total no plasma ou soro (ALLEN, 1994), referido como hiperhomocisteinemia. O fornecimento de metil-THF para a reação da MS é proveniente de duas fontes. A maior fração deriva do conjunto de FOL celular comum e é fornecido pela reação da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (ROZEN, 1996). Uma segunda fonte, particularmente nas células em divisão, é por meio da captação de metil-THF monoglutamato circulante (folato sérico). A desmetilação inicial deste folato, por meio da reação da MS é crítico por fornecer às células os folatos usados na reação de síntese de DNA (SHANE; STOKSTAD, 1985). Tanto a eliminação de HOMO quanto a formação de metil-THF estão sob regulação estrita da SAM e, portanto, das concentrações de metionina (FINKELSTEIN, 1990).

Quando o SAM está em excesso, a via de transulfuração é ativada, levando à eliminação da metionina. Por outro lado, quando o SAM está reduzido, a MTHFR é estimulada, e isso direciona o FOL da síntese de DNA e RNA para a conservação de metionina (SCOTT, 1981). A deficiência de FOL e VB12 levará a formação reduzida de metionina, e se o fornecimento de metionina é limitado, a atividade da MTHFR será estimulada, fornecendo assim mais metil-THF para MS. Durante a deficiência de VB12, no entanto, a função enzimática permanece prejudicada e desenvolve-se uma situação conhecida

como armadilha de metilfolato (HERBERT; ZALUSKY, 1962; SCOTT, 1981). O metil-THF acumula-se às custas de outros folatos celulares e a captação de folato do soro é evitada. Assim, os efeitos bioquímicos da deficiência de FOL e de VB12 são bastante semelhantes e incluem deficiência funcional de FOL, hiperhomocisteinemia e concentração de metionina muito baixo em relação a concentração de HOMO (REFSUM, 2001).

Figura 21. Inter-relação folato, vitamina B12 e homocisteína.



Legenda: DHF, dihidrofolato; DHFR, dihidrofolato redutase; MS, metionina sintase; MTHFR, metileno tetrahydrofolato redutase; SAH, S-adenosil homocisteína; SAM, S-adenosil metionina; SHMT, serina hidroximetiltransferase; THF, tetrahydrofolate; TS, timidilato sintase; X, variedade de substratos para metilação.

Fonte: Adaptado de EBARA, 2017

2.7.3 Análise Genética

2.7.3.1 Cariótipo Fetal

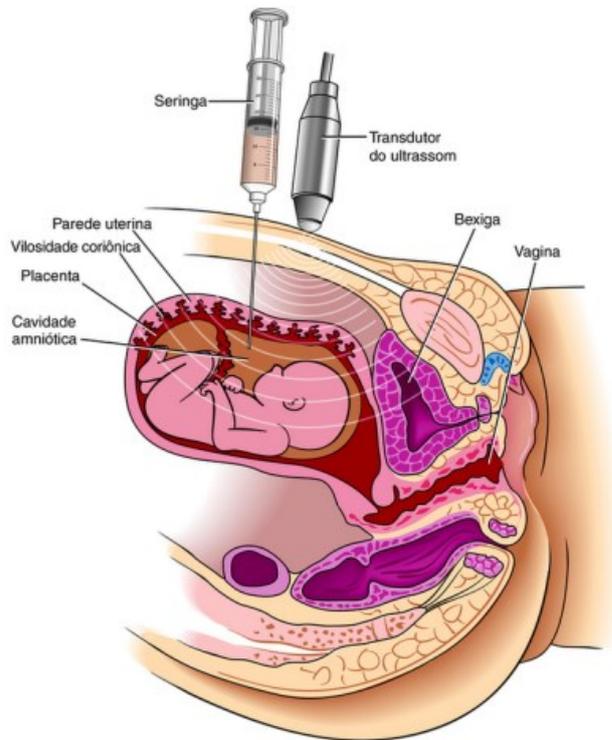
O cariótipo fetal pode ser determinado a partir de células do LQAM, coletadas por meio de amniocentese, de linfócitos de sangue fetal, obtidos por cordocentese ou por biópsia placentária. O LQAM está diretamente em contato com o feto (orofaringe, pulmão, trato

gastrointestinal, pele e sistema urinário), sendo frequentemente utilizado nos procedimentos de diagnóstico pré-natal (SLONIM et al., 2009). A pesquisa de anormalidades cromossômicas no LQAM confere informações clínicas preciosas, permitindo que os médicos e pais estejam preparados para oferecer os cuidados necessários ao bebê (HATTORI et al., 2015).

As indicações para a realização da amniocentese podem ser várias, dentre elas, gestante com idade superior a 35 anos, casos de histórico familiar de desordens genéticas, mulheres com histórico de filhos com anormalidades, ultrassons que tenham mostrado anormalidade fetal e em casos de triagem positiva para aneuploidias (CHANG et al., 2012; GHI et al., 2016; SERIN, 2013).

A amniocentese (Figura 22) é uma ferramenta essencial em obstetrícia. O teste invasivo continua sendo a única modalidade mais completa e precisa de diagnóstico genético fetal, incluindo anormalidades cromossômicas (CONNOLLY, 2016). O procedimento, geralmente, é realizado a partir da 15ª semana gestacional. Antes de realizar o procedimento, uma ultrassonografia deve ser realizada para avaliar a localização placentária e fetal e confirmar a idade gestacional e viabilidade fetal. Depois de preparar adequadamente o abdômen materno com solução antisséptica, o procedimento deve ser realizado sob contínua orientação ultrassonográfica (ROMERO et al., 1985).

Figura 22. Ilustração esquemática da amniocentese.



Fonte: SCHOENWOLF et al., 2016

2.8 DANO AO DNA

Cada uma das cerca de 10^{13} células no corpo humano recebe dezenas de milhares de lesões no DNA por dia. Estas lesões podem bloquear a replicação e transcrição do genoma, e se não forem reparados ou reparadas incorretamente, levam a mutações e/ou alterações do genoma em escala mais ampla, ameaçando a viabilidade celular ou do organismo. Danos ao DNA podem ser causados por compostos que derivam de espécies reativas de oxigênio, que ao atacar o DNA, prejudicam o pareamento de bases e/ou bloqueiam a transcrição e replicação do DNA, levam à perda de base ou a quebras de fita simples de DNA (JACKSON; BARTEK, 2009). A análise de dano ao DNA é usada em diferentes aplicações clínicas, dentre elas, avaliação de genotoxicidade, biomonitoramento e epidemiologia molecular (COLLINS et al., 2014; FENECH et al., 2016).

Em gestações normais, quando ocorre aumento do estresse oxidativo, os mecanismos antioxidantes são capazes de neutralizá-lo por meio da indução e atividade enzimática, bem

como através de protetores e eliminadores de radicais livres não enzimáticos. Contudo, essa adaptação e equilíbrio podem ser facilmente interrompidos (CASANUEVA; VITERI, 2003).

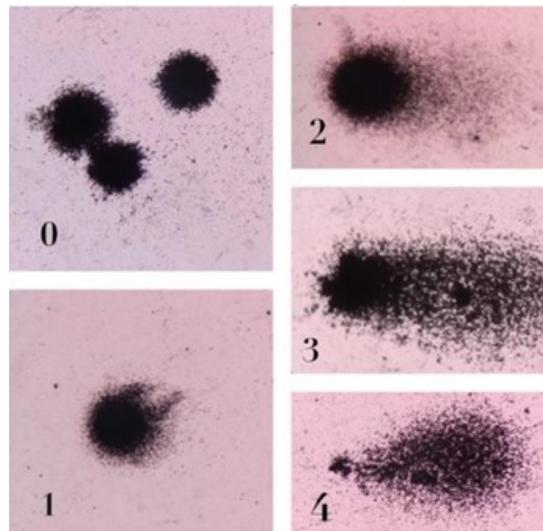
O dano ao DNA pode afetar múltiplos processos fisiológicos associados com a gestação, desde estágios iniciais como a maturação do oócito e qualidade do espermatozoide, até os processos mais tardios da gestação que envolvem a placenta e desenvolvimento fetal. Além disso, a capacidade de reparo do DNA tem se mostrado reduzida em gestantes, permitindo assim uma maior susceptibilidade a toxinas ambientais e endógenas que podem levar a doença (SKONER; SIGMON; LARCOM, 1995).

2.8.1 MARCADORES DE DANO AO DNA

2.8.1.1 Técnica do Cometa

A técnica do cometa é utilizada como marcador biológico de instabilidade genômica que avalia a genotoxicidade, pois permite quantificar lesões ao DNA antes da ação do sistema de reparo. Consiste em uma técnica rápida e sensível para medir sítios sensíveis ao pH básico (álcali-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). A técnica se baseia em uma eletroforese de célula única, por meio da qual o DNA danificado presente na célula irá migrar para o ânodo durante a corrida da eletroforese. Desta maneira, observa-se uma espécie de cauda, que se forma nas células danificadas. Essa cauda é formada pelo DNA desprendido do núcleo, devido a quebras de cadeia simples ou dupla, e seu comprimento é diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado (Figura 23). A migração é classificada em 4 classes, sendo atribuído o valor 0 para ausência de dano, 1 para as células com dano mínimo, 2 para as células com danos médios, 3 para as células com danos intensos e 4 para as células com danos máximos (OLIVE; BANÁTH, 2006).

Figura 23. Escore visual de dano ao DNA pela técnica do cometa.



Legenda: 0: dano ausente; 1: dano mínimo; 2: dano médio; 3: dano intenso e 4: dano máximo

Fonte: CORREGGIO, 2018

A técnica do cometa tem sido empregada para demonstrar o aumento do dano ao DNA em complicações durante a gestação (BABAZADEH et al., 2010; RAMAN et al., 2001; SIMON et al., 2010; WU et al., 2007). A capacidade de reparar danos ao DNA se mostrou reduzida quando pesquisadores compararam o reparo durante o período gestacional e seis meses após o parto, indicando que no período gestacional há uma maior susceptibilidade que pode levar ao aparecimento da carcinogênese (SKONER; SIGMON; LARCOM, 1995).

2.8.1.2 Técnica do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN citoma)

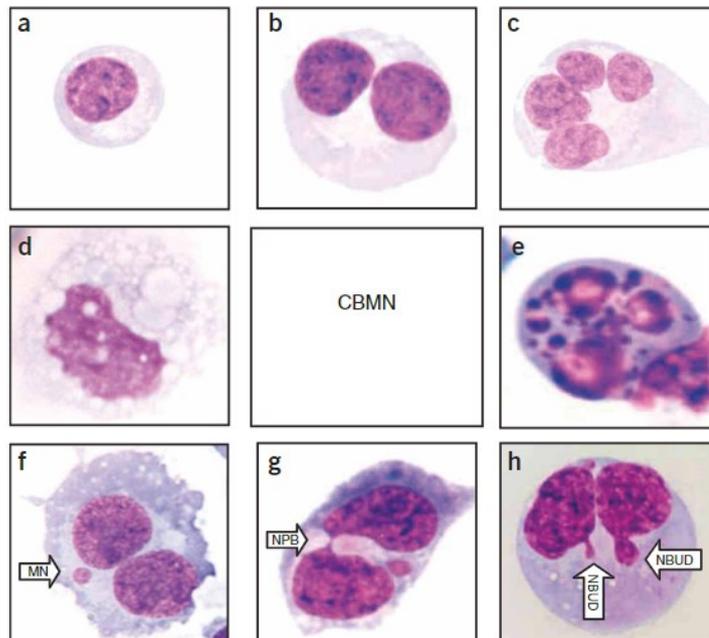
Outra metodologia empregada como biomarcador de dano ao DNA é a técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (CBMN) em linfócitos de sangue periférico (Figura 24). Esta técnica é considerada uma avaliação da mutagenicidade, pois avalia o dano ao DNA já estabelecido após a ação do sistema de reparo. Os micronúcleos (MNs) podem ter origem a partir de fragmentos ou de cromossomos inteiros, não segregados durante a anáfase da mitose, que se tornam encapsulados por envoltório nuclear e que ficam fora do núcleo da célula filha durante a telófase (FENECH, 2000). A técnica CBMN também permite quantificar outros marcadores de dano citogenético como pontes nucleoplasmáticas (NPBs) provenientes do reparo incorreto de quebras de DNA ou fusões de porções finais dos

telômeros e brotos nucleares (NBUDs), que são produtos da eliminação de DNA amplificado ou complexos de DNA reparado.

Além das alterações acima citadas, esse ensaio permite calcular o índice de divisão nuclear (IDN) ou índice mitótico, por meio da avaliação da presença de células mono, bi, tri e tetranucleadas presentes na amostra em análise e avaliação da condição de viabilidade celular, por meio da análise da presença de células que estão no estado de apoptose ou necrose (EASTMOND; TUCKER, 1989; FENECH, 2007; FENECH et al., 2016).

O IDN, marcador de proliferação celular, pode apresentar 1,0 como menor valor e isso ocorre em caso de falha na divisão de células viáveis durante o bloqueio da citocinese, resultando apenas na presença de células mononucleadas. Caso todas as células viáveis completem um ciclo de divisão, o valor do IDN será 2,0. Se algumas células viáveis completarem mais de uma divisão nuclear durante a fase de bloqueio da citocinese, elas conterão mais de dois núcleos (FENECH, 2007; IONESCU et al., 2011).

Figura 24. Células analisadas pela técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).



Legenda: A) Célula mononucleada, B) Célula binucleada, C) Célula tetranucleada, D) Célula em estágio inicial de necrose, E) Célula em estágio tardio de apoptose, F) Célula binucleada contendo um micronúcleo, G) Célula binucleada contendo uma ponte e um micronúcleo, H) Célula binucleada contendo brotos.

Fonte: FENECH, 2007

3 SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS PARTICIPANTES

Para realização deste estudo foram recrutadas, via demanda espontânea, gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal de alto risco fetal e medicina fetal da maternidade do HU/UFSC/EBSERH, que apresentaram alguma alteração no exame ultrassonográfico e por isso, seriam submetidas a coleta do LQAM, para posterior determinação do cariótipo fetal. Estas pacientes foram, então, convidadas a participar desta pesquisa e, no momento da aceitação, receberam informações acerca dos objetivos do estudo e assinaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) referentes a coleta do líquido amniótico e a coleta de sangue periférico (ANEXOS A e B). Além disso, receberam uma cópia assinada pela pesquisadora responsável, com explicações gerais sobre a pesquisa, conforme orientação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da UFSC e responderam a um “Questionário de Saúde Pessoal” adaptado da Comissão Internacional de Proteção a Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (ICPEMC) (CARRANO; NATARAJAN, 1988) (ANEXO C). O grupo em questão foi denominado de Gestantes com Malformação Fetal (GMF).

Este trabalho apresenta dois grupos controles. Um deles formado por gestantes sem alterações fetais, aqui denominado grupo Gestantes Controle (GC) e o outro formado por mulheres Não Gestantes (NG) em idade fértil. O grupo GC foi composto por gestantes com idade gestacional de 15 semanas ou mais e exame de imagem sem alteração que compareceram à ULAC-HU-UFSC/EBSERH para realização de exames de rotina do pré-natal. O grupo NG, por sua vez, foi composto por funcionárias, estudantes e pacientes que compareciam à ULAC-HU-UFSC/EBSERH. A ambos os grupos foram solicitadas a assinatura do TCLE e o preenchimento do “Questionário de Saúde Pessoal”.

O cálculo amostral foi realizado através do programa WinPepi versão 8.0, levando em consideração a variação normalmente encontrada nas técnicas que foram aplicadas neste estudo para um nível de significância de 5%.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH UFSC) sob parecer de número 2.621.522 (ANEXO D).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão do grupo GMF foram os seguintes: 18 anos ou mais de idade; idade gestacional de 15 semanas ou mais; tipagem sanguínea e fator Rh conhecidos, bem como sorologia para o vírus da imunodeficiência humana (HIV); alterações na morfologia fetal à ultrassonografia que possam estar associadas a anomalias cromossômicas; e consentimento em realizar o procedimento invasivo para diagnóstico cromossômico fetal.

O critério de exclusão do grupo GMF foi: feto cuja única alteração observada na ultrassonografia fosse aumento da TN e o resultado do cariótipo fetal fosse normal.

Os critérios de inclusão do grupo GC foram: 18 anos ou mais de idade e 15 semanas ou mais de idade gestacional.

Os critérios de inclusão do grupo NG foram: 18 anos ou mais de idade, estar em idade fértil, ausência de doenças crônicas conhecidas e não estar gestante.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

O LQAM das gestantes com indicação médica para determinação do cariótipo fetal foi coletado por amniocentese transabdominal, realizada por profissional médico habilitado. A coleta foi realizada sob condições antissépticas, utilizando uma agulha de calibre 22 G, monitorada por ultrassom. De cada gestante foi coletado em torno de 20 mL de LQAM. Após a coleta, o material foi transportado até a Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do HU/UFSC/EBSERH. As gestantes controles não tiveram LQAM coletado.

As amostras de sangue periférico, de todas as participantes desta pesquisa, foram obtidas através de punção venosa periférica, sob as devidas condições antissépticas, por profissionais habilitados da ULAC-HU-UFSC/EBSERH. Para cada paciente foram coletados um tubo de 4 mL, previamente refrigerado, contendo o anticoagulante EDTA, para a dosagem de HOMO, um tubo de 4 mL com o anticoagulante heparina (imediatamente protegido da luz após a coleta), para avaliação das alterações nucleares e dano ao DNA, um tubo seco de 4 mL com gel separador, para dosagem de AFP, VB12 e FOL.

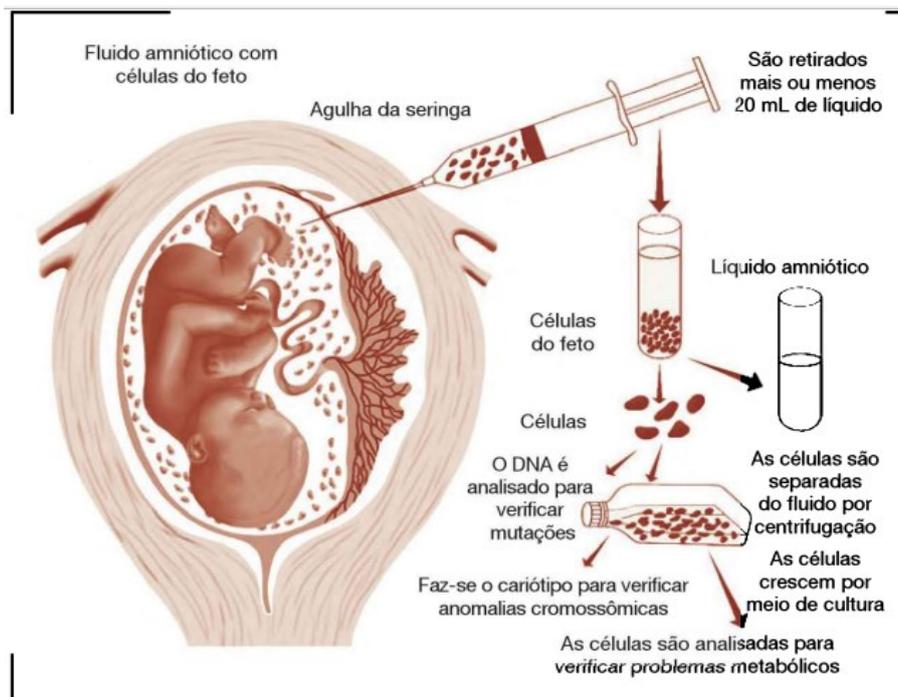
De acordo com a classificação dos períodos gestacionais por semanas, gestantes entre 14 e 27 semanas foram classificadas como pertencentes ao segundo trimestre gestacional e as gestantes com 28 semanas ou mais foram consideradas como pertencentes ao terceiro trimestre gestacional (BRASIL, 2000).

3.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

3.4.1 Cariótipo fetal de líquido amniótico

As amostras de LQAM foram encaminhadas para o Laboratório de Citogenética e Estabilidade Genômica (LACEG) da ULAC-HU-UFSC/EBSERH. O volume contido na seringa foi transferido para tubo cônico de 15 mL e centrifugado à 300 g por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao pellet foi adicionado 5 mL de meio de cultura Amnio Max Complete (GIBCO). A mistura foi transferida para 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 (Figura 25). 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.

Figura 25. Coleta e cultivo de líquido amniótico.



Fonte: MALUF; RIEGEL, 2011

Duas vezes por semana o meio de cultura consumido foi descartado, e 5 mL de meio de cultura novo a 37°C foram adicionados. Após atingir a confluência celular adequada, 60

μL de colchicina (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cultura) foram adicionados à cultura celular, com posterior incubação na mesma estufa por 45 minutos.

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 dessa vez permaneceu em contato com as células por aproximadamente 40 segundos. 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 porventura ainda ficaram aderidas, foram soltas com a ajuda mecânica por meio 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 a 300 g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 mL de KCl (0,075 M). O KCl permaneceu em contato com a amostra por 11 minutos, seguido da adição de 0,5 mL de fixador (metanol: ácido acético – 3:1, v:v), homogeneização e centrifugação (300 g por 8 minutos).

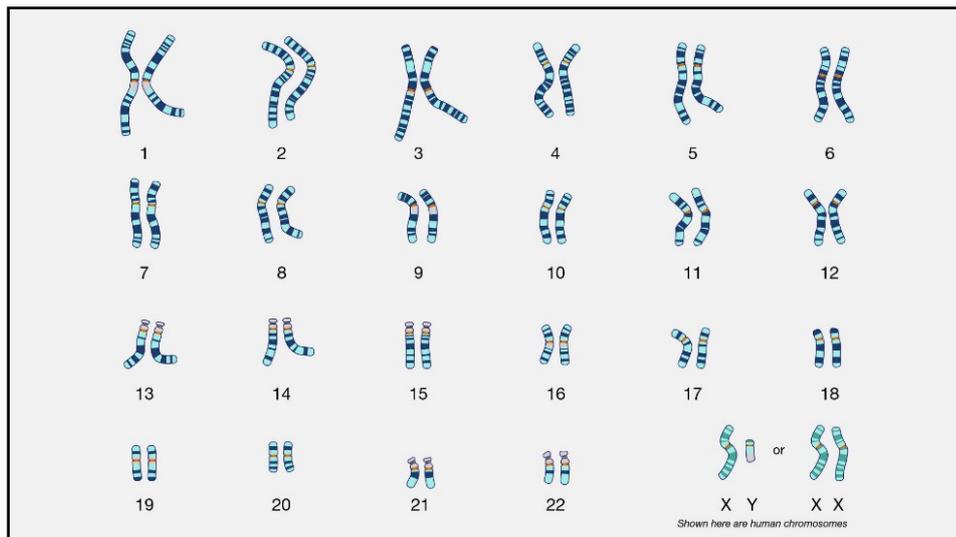
O sobrenadante foi novamente retirado e foi adicionado aos poucos, com cuidadosa homogeneização, 2 mL de fixador. A amostra ficou em geladeira por 10 minutos e em seguida foi centrifugada a 300 g por 8 minutos.

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 ressuspenso 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 (bandeamento G pela Tripsina usando Giemsa), 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 soro fetal bovino), lavadas em água destilada e, em seguida, coradas com solução de Giemsa (10%) por 3 minutos (GUS, 2011; MIRANDA; MATTEVI, 2011).

As análises foram realizadas por meio 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 (Figura 26). Foi utilizado o sistema GeneAll® da Qualitem para captura e montagem do cariótipo.

Figura 26. Cariótipo normal 46 XY/XX.



Fonte: NIH, 2023

3.4.2 Dosagem de marcadores bioquímicos

Após a separação do conteúdo celular para a realização do cariótipo fetal, o sobrenadante do LQAM foi enviado ao setor de imunquímica da ULAC-HU-UFSC/EBSERH, onde, juntamente com as amostras de sangue previamente coletadas, foram realizadas dosagens de AFP, VB12, FOL e HOMO. Os três primeiros analitos foram quantificados no soro e no sobrenadante do LQAM, pela metodologia de quimioluminescência por micropartículas, no equipamento Advia Centaur XP®/Siemens (Siemens Healthineers). A dosagem de HOMO foi feita pela metodologia de quimioluminescência no equipamento Immulite 2000®/Siemens (Siemens Healthineers), em amostras de plasma e LQAM.

As dosagens realizadas no equipamento Advia Centaur XP® consistem em um imunoenensaio em "sanduíche", que utiliza tecnologia quimioluminométrica direta. Para as dosagens de VB12 e FOL, as amostras são previamente tratadas para remoção de proteínas de

ligação endógenas. O equipamento pipeta a amostra, adiciona o reagente Lite (anticorpo anti-AFP/VB12/FOL policlonal purificado de coelho marcado com éster de acridina) e a fase sólida (anticorpo anti-AFP/VB12/FOL monoclonal de rato, covalentemente associado a partículas paramagnéticas) e mantém em incubação por alguns minutos a 37°C. Em seguida, as cuvetes são separadas, aspiradas e lavadas com água reagentes. Para iniciar a reação de quimioluminescência, 300 µL de reagente ácido e 300 µL de reagente alcalino são adicionados. A reação resultante é medida como URL. Existe uma relação direta entre as concentrações de AFP e as URL detectadas pelo sistema óptico do equipamento e uma relação inversa entre as concentrações de FOL e VB12 presente na amostra do paciente e a quantidade de URL detectadas pelo sistema. Os resultados de AFP e FOL foram expressos em ng/mL e os de VB12 em pg/mL.

A quantificação de HOMO, no equipamento Immulite 2000, foi por imunoensaio competitivo, no qual, a amostra de plasma é inicialmente pré-tratada com S-adenosil-L-homocisteína (SAH) hidrolase e ditioneitol (DTT) num tubo de reação sem esfera. Depois a amostra tratada é transferida para um segundo tubo de reação contendo uma esfera de polistireno revestida com SAH e anticorpo específico para SAH marcado com fosfatase alcalina. Segue-se uma incubação de 30 minutos, na qual a SAH convertida da amostra previamente tratada compete com a SAH imobilizada pela ligação ao anticorpo anti-SAH marcado com fosfatase alcalina. O conjugado enzimático não ligado é removido pela lavagem por centrifugação e o substrato é adicionado, seguido da quantificação. Os resultados de HOMO foram expressos em µmol/L.

A sensibilidade analítica para os marcadores bioquímicos quantificados neste estudo foi de 1,3 ng/mL para AFP, de 45 pg/mL para VB12, de 0,35 ng/mL para FOL e 2 µmol/L para HOMO.

Os valores de referência para os analitos quantificados no sangue neste estudo são aqueles disponibilizados nas bulas dos reagentes e estão expressos na tabela 2. Os valores de bula previstos para a AFP no LQAM variam conforme a idade gestacional e encontram listados na tabela 2. Os analitos FOL, VB12 e HOMO não possuem valor de referência de bula para dosagens no LQAM.

Tabela 2. Valores de referência de marcadores bioquímicos no sangue e líquido amniótico, conforme bula do reagente.

Analito	Valores de Referência		
	Sangue	Líquido amniótico	
		Semana gestacional	Mediana ($\mu\text{g/mL}$)
AFP	< 8,1 ng/mL	15	17,3
		16	14,3
		17	11,9
		18	9,8
		19	8,1
		20	6,7
FOL	> 5,38 ng/mL		
VB12	211 a 911 pg/mL		
HOMO	5,0 - 12 $\mu\text{mol/L}$		

Fonte: Adaptado de Siemens, 2020

3.4.3 Técnica do Cometa/Eletroforese em Gel de Célula Única

Esta técnica foi realizada conforme descrita por Singh e colaboradores (1988) e adaptada por Tice e colaboradores (2000). Inicialmente foram preparadas as lâminas com pré-cobertura de agarose regular 0,75%, usadas após secagem de no mínimo duas horas.

Ao abrigo da luz, em microtubo de centrifugação, foi misturado 5 μL de sangue periférico heparinizado ou 5 μL do pellet do LQAM (previamente centrifugado a 300 g por 6 minutos e removido o sobrenadante) com 95 μL 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 previamente preparada. 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.

Após 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 pH = 10 (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 horas e no máximo 7 dias. As lâminas foram expostas por 20 minutos ao tampão alcalino gelado (NaOH, EDTA 200nM e água destilada, pH > 13) e em seguida submetidas a eletroforese realizada em geladeira, por 20 minutos, 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 minutos, 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 (nitrato de amônio 0,02%, nitrato 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 cada eletroforese realizada foi acrescentada ao menos uma lâmina de amostra tratada com H₂O₂ 10 µM para ser utilizada como controle positivo (segundo os mesmos passos que as demais lâminas). Para a análise, de forma cega por um único observador, foi utilizado o aumento de 200 vezes em microscópio óptico (ZEISS Primo Star), 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 observado 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 danos, 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), como representado na figura 4. 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).

3.4.4 Técnica de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (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 e 2% de fitohemaglutinina) em tubo falcon e colocado em estufa a 37°C, por 72 h. Após 44 h em cultura, foi acrescentado citocalasina B (5 mg/mL de cultura) de forma estéril. Ao completar 72h em cultura, foi realizada a retirada da cultura celular. Os tubos falcon foram centrifugados à 300 g por 6 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e 5 mL de KCl (0,075 M) foram adicionados, permanecendo em contato com a amostra por 7 minutos, posteriormente foi adicionado 0,5 mL de fixador (metanol e ácido acético - 3:1) e centrifugado (300 g por 6 minutos). O sobrenadante foi novamente retirado e 5 mL de fixador (metanol e ácido acético - 3:1) adicionado aos poucos, com cuidadosa homogeneização. A amostra ficou na geladeira por 10 minutos e em seguida foi centrifugada a 300 g por 6 minutos. 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 ressuspensionado. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas, onde foram utilizadas duas gotas do material sobre a lâmina (previamente lavada e deixada no congelador por alguns minutos para formar uma camada de gelo e permitir a dispersão do material). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (10%) por 5 minutos. As análises foram realizadas de forma cega por um único observador, por microscopia óptica (ZEISS Primo Star), com aumento de 200 vezes, com confirmação das estruturas em aumento de 1000 vezes. A frequência de biomarcadores de danos ao DNA (MN, NPBs e NBUDs) foi classificada em 1.000 células binucleadas, como representado na figura 24.

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.

3.4.5 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) em líquido amniótico e soro

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, IFN- γ e IL-10, nas amostras de LQAM e sangue das participantes desta pesquisa, foram determinadas por ELISA do tipo sanduíche, utilizando-se conjuntos de diagnósticos BD OptEIA™ (Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A sensibilidade dos ensaios foi de 2,2 pg/mL para IL-6, 6,23 pg/mL para TNF- α , 1,0 pg/mL para MCP-1, 0,4 pg/mL para IL-10, 1,0 pg/mL para IL-1 β e 0,173 pg/mL para IFN- γ . A densidade óptica das amostras foi obtida no leitor de microplacas MB-500 (Heales, Gouwei Road, SZX, CN) a 450 nm. Para o cálculo da concentração das citocinas foi feita uma regressão linear entre densidade óptica e a concentração correspondente de acordo com a curva padrão. Por meio da equação da reta, foi possível calcular a concentração de cada amostra. Todos os resultados foram expressos em pg/mL.

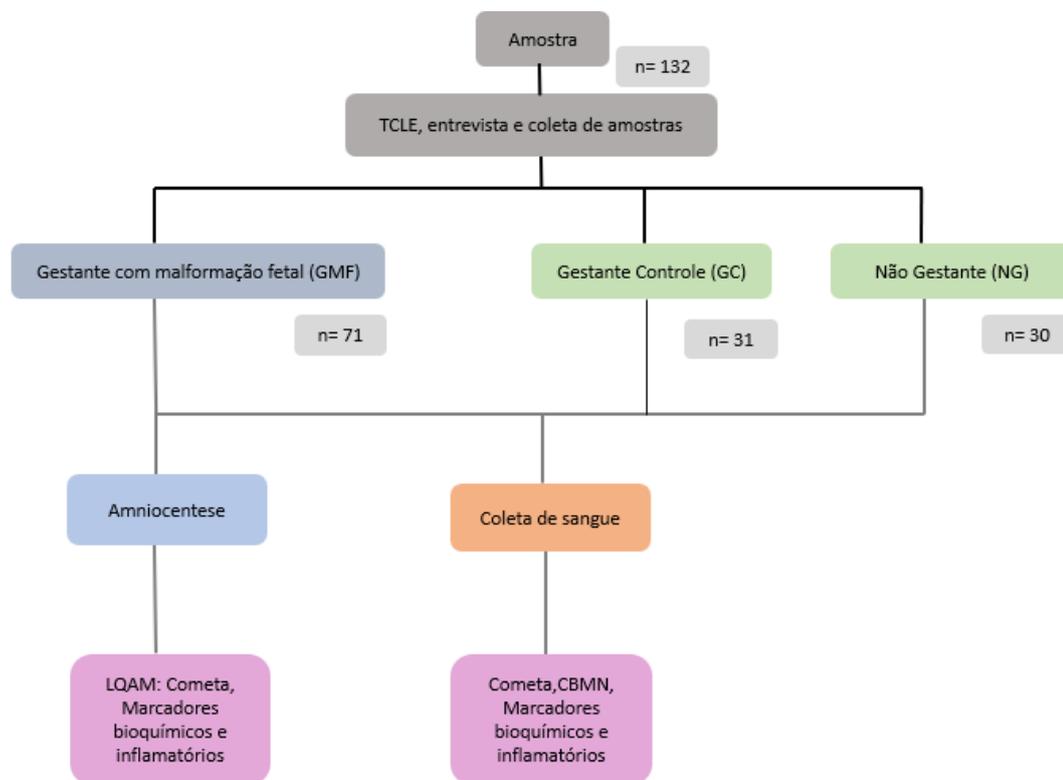
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados deste estudo foi realizada pelo programa Graph Pad Prism™ 5.0.0.288. Para a avaliação da normalidade utilizou-se o teste de 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 Student ou teste U de Mann-Whitney, quando foram dois grupos e ANOVA ou Kruskal-Wallis para comparações de três grupos ou mais. O teste de Wilcoxon foi empregado para comparar os resultados do sangue com LQAM. Para correlação dos dados quantitativos foi empregado o teste de Spearman. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A força da correlação foi classificada de acordo com o coeficiente de correlação, tendo como ponto de corte os seguintes valores de r: 0,0 | 0,25 fraca, 0,25 | 0,50 regular, 0,50 | 0,75 moderada e 0,75 | 1,0 forte.

3.6 FLUXOGRAMA DO ESTUDO

As etapas desenvolvidas ao longo deste trabalho, bem como o “n” amostral e os procedimentos realizados estão demonstrados na figura 27.

Figura 27. Fluxograma do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Todas as participantes desta pesquisa apresentaram perfil etário homogêneo, não houve diferença entre os três grupos analisados ($p= 0,441$). A mediana de idade para os grupos GMF, GC e NG foi de 31,01; 30 e 32,5 respectivamente. Com relação da idade gestacional, não foi encontrada diferença entre os grupos GMF e GC ($p= 0,348$). O grupo GMF apresentou mediana de 24 semanas e o grupo de GC apresentou mediana de 23 semanas. No grupo GMF, 49 mulheres estavam no segundo trimestre gestacional e 22 mulheres no terceiro trimestre, no grupo GC, 27 mulheres estavam no segundo trimestre gestacional e 4 mulheres no terceiro trimestre (Tabela 3).

A maioria das participantes pertenciam ao grupo étnico caucasiano (80,3% do grupo GMF; 74,2% do grupo GC e 83,3% do grupo NG). Mais de 50% das participantes de todos os grupos afirmaram ingerir café diariamente. Com relação ao histórico de fumo, 16,9% do grupo GMF declarou ter sido fumante; 29% do grupo GC e 36,7% do grupo NG. Quanto aos hábitos alimentares, nenhuma participante do grupo GMF se declarou vegetariana. Já no grupo GC e no grupo NG, 6,5% e 6,7% das participantes eram vegetarianas. No grupo das GMF, 35,2% estavam na primeira gestação, já no grupo GC, 90,3% eram primigestas. Com relação ao questionamento sobre ter dificuldade para engravidar, no grupo GMF 7,0% declararam que tiveram dificuldade e no grupo GC 6,5%. Menos de 10% das gestantes deste estudo declararam ter tido aborto prévio. Com relação aos filhos prematuros, 11,3% do grupo GMF e 9,7% do grupo GC declarou ter tido (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização da população estudada.

	GMF n= 71	GC n= 31	NG n= 30
Idade (anos)			
(média±DP*)	31,20±7,22	29,84±5,74	32,03±6,44
mediana	31,01	30	32,5
(mínimo-máximo)	(18 – 42)	(21 – 43)	(21 – 44)
IG (semanas)			
(média±DP*)	23,88±4,61	23,07±3,98	
mediana	24	23	-
(mínimo-máximo)	(15 – 35)	(15 – 33)	-
2º Trimestre	49 (69%)	27 (87%)	
3º Trimestre	22 (31%)	4 (13%)	
Grupo étnico (%)			
Caucasiano	80,3	74,2	83,3
Afrodescendente	14,7	16,1	6,6
Outros	4,9	9,7	10
Estado civil (%)			
Casada	50,8	58,1	26,7
Solteira	44,3	38,7	66,7
Divorciada	3,3	3,2	6,7
Viúva	1,6	-	-
Ingestão diária de café (%)	78,9	83,9	90
Histórico de fumo (%)	16,9	29	36,7
Vegetariana (%)	0,0	6,5	6,7
Primigesta (%)	35,2	90,3	-
Dificuldade para engravidar (%)	7,0	6,5	-
Abortos prévios (%)	7,0	9,7	-
Filhos prematuros (%)	11,3	9,7	-

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Legenda: Tabela com a descrição do perfil das participantes deste estudo, de acordo com os grupos em que foram divididas. Os valores estão representados como média±DP, mediana, valores mínimo e máximo e percentual. GMF: Gestantes com Malformação Fetal; GC: Gestantes Controle e NG: Não Gestantes. IG: Idade Gestacional. *DP: desvio padrão.

No presente trabalho, 71 (setenta e uma) participantes compuseram o grupo de gestantes que tiveram o LQAM coletado. A determinação do cariótipo foi possível em 69 (sessenta e nove) dessas amostras. Para duas participantes não foi possível a determinação do cariótipo fetal devido à ausência de crescimento celular em meio de cultura. Dentre as 69 participantes que tiveram o cariótipo fetal determinado, duas foram excluídas desta pesquisa porque o cariótipo era normal e a única alteração observada na ultrassonografia foi aumento da TN. Dos 67 cariótipos incluídos neste estudo, 34 (50,74%) apresentavam alguma alteração, incluindo numérica ou estrutural. Desses 34 cariótipos com alterações, 26 (76,47%) deles apresentavam aneuploidia, sendo elas a trissomia do 13 (Síndrome de Patau, n= 5), do 18 (Síndrome de Edwards, n= 10), do 21 (Síndrome de Down, n=9), trissomia 22 (n=1) e trissomia de cromossomo marcador (n= 1). Dentre as alterações estruturais, foi verificada a presença de inversão no cromossomo 1 e 9, material adicional de origem desconhecida na banda q23 do cromossomo 18. Alguns fetos apresentaram cromossomos com variações no tamanho de parte de sua estrutura, como a presença de satélites e hastes de satélites aumentadas nos cromossomos 15 e 22 e região de heterocromatina aumentada nos cromossomos 9 e 16 (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil dos cariótipos determinados neste estudo.

Cariótipos com alterações estruturais	Cariótipos com alteração numérica	Cariótipos normais
46,XX,15ps+ (n=1)	47,XY+13 (n= 3)	46,XX (n= 17)
46,XX,inv(9)(p11q12) (n=1)	47,XX+13 (n= 2)	46,XY (n= 18)
46,XY,16qh+(n=1)	47,XY+18 (n= 5)	
46,XY,add(18)(q23)[20] (n=1)	47,XX+18 (n= 5)	
46,XY,22pstk+(n=1)	47,XY+21 (n= 9)	
46,XX,inv(1)(p11q12) (n=1)	47,XY+22 (n= 1)	
46,XY,9qh+ (n= 1)	47,XY+mar (n= 1)	

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho

Diversas alterações ultrassonográficas foram encontradas nos fetos das gestantes pertencentes ao grupo GMF, dentre elas pode-se citar: TN aumentada, oligodramnia,

polidramnia, malformação cardíaca complexa, hidropsia fetal, higroma cístico, hidrocefalia, onfalocele, espinha bífida, crescimento intrauterino restrito, holoprosencefalia, microcefalia, hidrotórax, hipotelorismo, hipertelorismo, polidactilia, contraturas de mãos e pés, osso nasal ausente, encurtamento de ossos longos, rins em ferradura, fissura lábio-palatina. Em alguns fetos mais de uma alteração estava presente.

Nas Tabelas 5 e 6 estão detalhados os principais achados ultrassonográficos, nas alterações cromossômicas numéricas (aneuploidias) e estruturais, respectivamente, deste estudo.

Tabela 5. Alteração cromossômica numérica e achados ultrassonográficos.

Aneuploidia	Achados ultrassonográficos
Trissomia do 13	Holoprosencefalia, anoftalmia, cardiopatia, polidactilia, agenesia de vermis cerebelar, megacisterna magna, rins ecogênicos, oligodramnia e malformação cardíaca complexa, microftalmia bilateral, hipertelorismo, narina única, onfalocele, desvio lateral da coluna toráco-lombar, dilatação da pélvis renal bilateral, pés em mata-borrão, dedos das mãos displásicos, fissura labiopalatina, microcefalia
Trissomia do 18	Cardiopatia, TN aumentada, espinha bífida, hidropsia fetal, higroma cístico e malformação cardíaca complexa, cistos de plexo coroide, braquicefalia, polidramnia, displasia de dedos das mãos, fissura lábio-palatina, micrognatia, onfalocele contendo fígado e vesícula, cisto de cordão umbilical, crânio em morango, polidramnia, sobreposição dos dedos das mãos, hérnia diafragmática, rins em ferradura, fissura lábio-palatina, posição viciosa de dedos das mãos, cabeça em formato anormal, onfalocele, cisto de cordão, pé torto unilateral
Trissomia do 21	TN aumentada, defeito de septo atrioventricular, hipoplasia osso nasal

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Tabela 6. Alteração cromossômica estrutural e achados ultrassonográficos.

Alteração Estrutural	Achado ultrassonográfico
46,XX,15ps+ (n=1)	Arnold Chiari 2, raquisquise, pré-operatório intrauterino
46,XX,inv(9)(p11q12) (n=1)	Cardiopatia complexa
46,XY,16qh+(n=1)	Dupla via de saída do ventrículo direito e estenose de artéria pulmonar
46,XY,add(18)(q23) [20] (n=1)	Cardiopatia complexa, holoprosencefalia, fenda labopalatina
46,XY,22pstk+(n=1)	Onfalocele
46,XX,inv(1)(p11q12) (n=1)	Hidropsia fetal
46,XY,9qh+ (n= 1)	Hidrotórax fetal à esquerda

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Foi analisado o perfil etário do grupo GMF cujos fetos foram diagnosticados com aneuploidia. Para fetos com trissomia do 13, a mediana da idade materna foi de 39 anos (25-42), para trissomia do 18, a mediana da idade materna foi de 35,6 anos (28-42), para trissomia do 21, a mediana da idade materna foi de 38 anos (21-41). A mediana da idade materna para todas as gestantes cujos fetos apresentavam aneuploidia foi de 37 anos (21-42) (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil etário das gestantes de fetos com trissomias.

Trissomia (n)	Mediana idade (intervalo)
Cromossomo 13 (5)	39,0 (25-42)
Cromossomo 18 (10)	35,6 (28-42)
Cromossomo 21 (9)	38 (21-41)
Todas as trissomias (24)	37 (21-42)

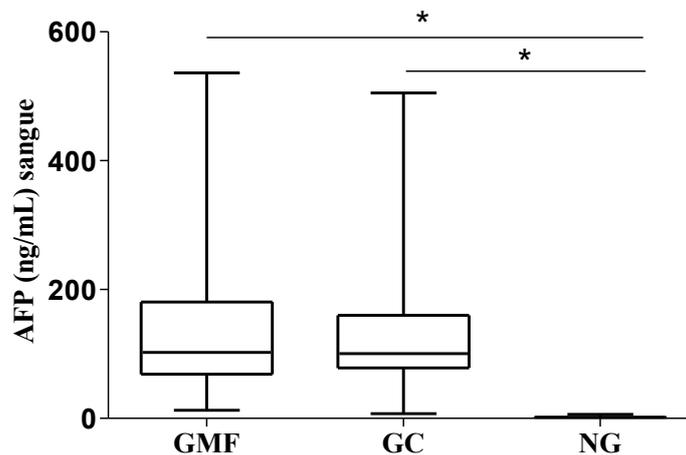
Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho

4.2 ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS

4.2.1 Alfetoproteína

As concentrações sanguíneas de AFP não diferiram entre os grupos GMF e GC ($p=0,944$). Quando comparados os grupos GC com NG, GMF com NG foi observada diferença para ambas as comparações ($p < 0,0001$) (Figura 28). Todas as participantes do grupo NG apresentaram concentrações de AFP dentro dos valores de referência para indivíduos saudáveis e não grávidas (Tabela 2).

Figura 28. Comparação entre as concentrações sanguíneas de alfafetoproteína entre os grupos analisados.



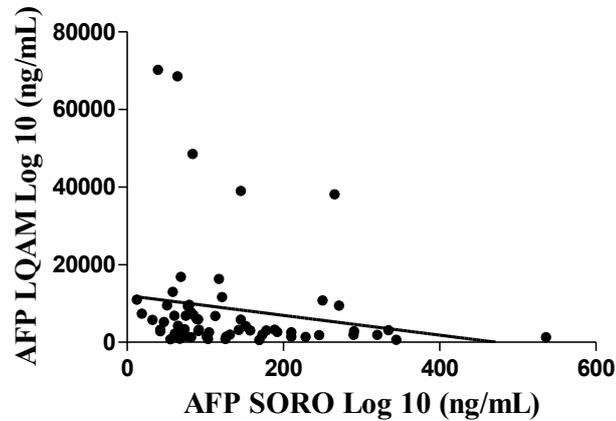
Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: AFP: alfafetoproteína, GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes. Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

O grupo GMF foi dividido conforme a presença de cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias. A comparação das concentrações de AFP no sangue das gestantes desses dois subgrupos não apresentou diferença, conforme dado na Tabela 8.

Outra análise realizada neste estudo foi verificar se havia correlação entre a dosagem dos marcadores bioquímicos presentes no sangue e no LQAM das gestantes do grupo GMF. Foi encontrada correlação negativa ($p=0,0061$, $r=-0,345$) para as concentrações de AFP entre os dois tipos de amostras (Figura 29).

Figura 29. Correlação entre as concentrações de alfafetoproteína no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.

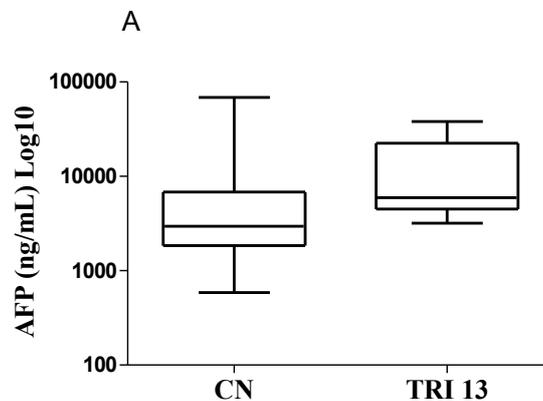


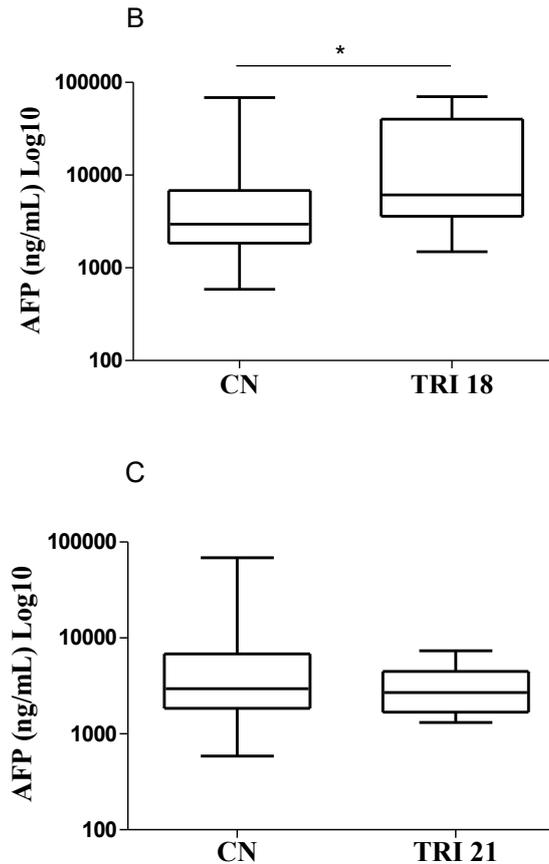
Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Nota: Correlação de Spearman. AFP (alfafetoproteína) ($p=0,0060$, $r=-0,345$).

Na sequência foi realizada a comparação do resultado das dosagens de marcadores bioquímicos no LQAM de gestantes com fetos cujos cariótipos eram normais e aqueles com trissomias. A dosagem de AFP no LQAM dos cariótipos normais comparada àqueles que apresentavam trissomias, mostrou diferença em relação a trissomia do 18, sendo as concentrações mais elevadas encontradas no grupo desta trissomia ($p=0,034$) (Figura 30, B). Em relação as outras trissomias, não foram encontradas diferenças, trissomia 13 ($p=0,080$), trissomia do 21 ($p=0,580$) (Figura 30, A e C).

Figura 30. Comparação das concentrações de alfafetoproteína no líquido amniótico entre cariótipo normal e cariótipo com trissomia.



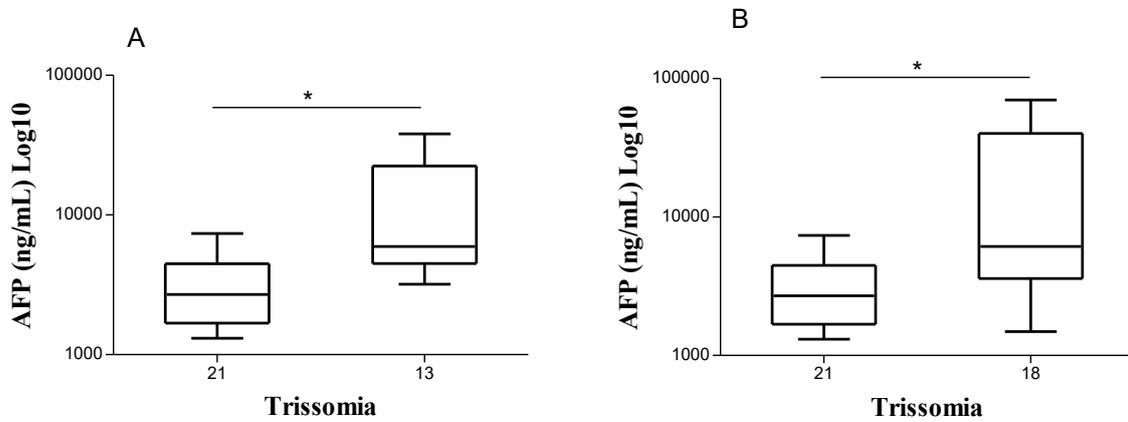


Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: (A) Cariótipo normal comparado com cariótipo com trissomia do 13. (B) Cariótipo normal comparado com cariótipo com trissomia do 18. (C) Cariótipo normal comparado com cariótipo com trissomia do 21. CN: cariótipo normal, AFP: alfafetoproteína, TRI: trissomia. Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Outra análise realizada foi a comparação das concentrações de AFP, dosados no LQAM, entre os grupos de trissomias do 13, 18 e 21 (Tabela 9). As concentrações estavam reduzidas na trissomia do 21, com mediana de 2699 ng/mL (1313 - 7363 ng/mL), quando comparada a trissomia do 13, com mediana de 5944 ng/mL (3193 - 38089 ng/mL) ($p = 0,029$) (Figura 31, A) e quando comparada a trissomia do 18, cuja mediana foi de 6128 ng/mL (1489 - 70150 ng/mL) ($p = 0,043$) (Figura 31, B). A comparação das dosagens de AFP no grupo com trissomia do 13 com a trissomia do 18 não apresentou diferença ($p = 0,953$) (Tabela 9).

Figura 31. Comparação das concentrações de alfafetoproteína no líquido amniótico entre as trissomias.



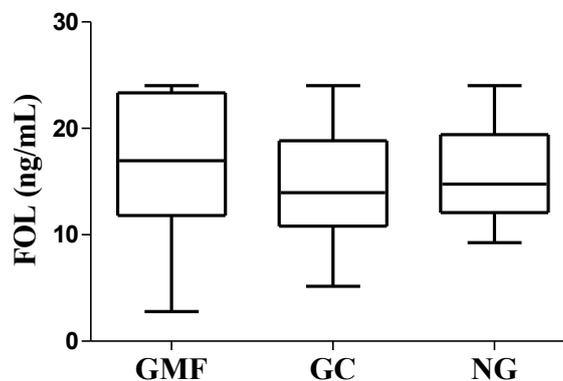
Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: (A) Trissomia do 21 comparada com trissomia do 13. (B) Trissomia do 21 comparada com trissomia do 18. AFP: alfafetoproteína. Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

4.2.2 Folato

Em relação a dosagem sanguínea de folato, não foi observada diferença na comparação entre os grupos GMF e GC ($p = 0,129$), GMF e NG ($p = 0,260$) e GC e NG ($p = 0,668$) (Figura 32).

Figura 32. Comparação entre as concentrações sanguíneas de folato entre os grupos analisados.



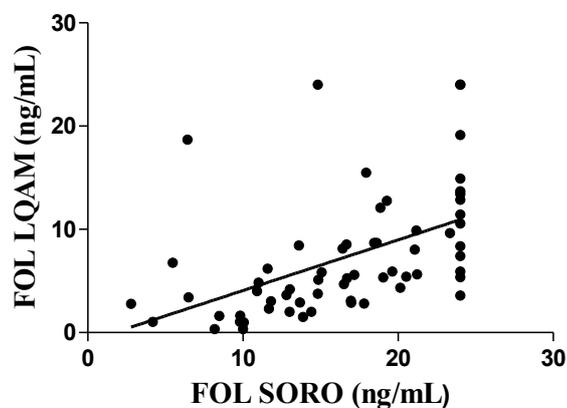
Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes; FOL: folato. Teste de Kruskal-Wallis.

A comparação das concentrações de FOL no sangue das gestantes do grupo GMF, subdividido em grupo com cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias, não apresentou diferença (Tabela 8). Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p= 0,256$), cariótipo normal e trissomia do 18 ($p= 0,907$) e cariótipo normal e trissomia do 21 ($p= 0,584$).

Em relação a correlação entre a concentração de FOL no sangue e no LQAM, foi encontrada correlação positiva ($p< 0,0001$, $r= +0,641$) (Figura 33).

Figura 33. Correlação entre as concentrações de folato no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: Correlação de Spearman. FOL (folato) ($p< 0,0001$, $r= +0,641$).

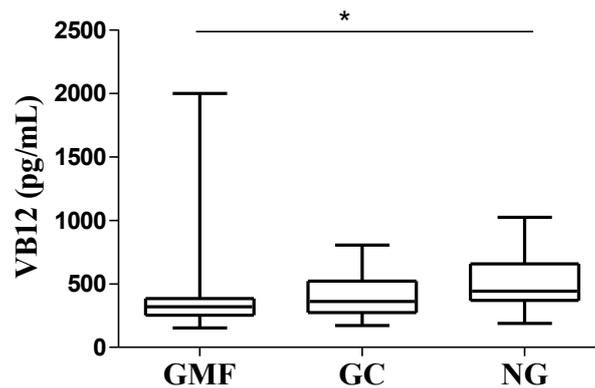
Na comparação entre os marcadores dosados no LQAM de gestantes do grupo GMF, subdividido conforme o cariótipo fetal, cariótipo normal e cariótipo com trissomias, as concentrações de FOL não apresentaram diferença. Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p=0,390$), cariótipo normal trissomia do 18 ($p=0,859$) e cariótipo normal trissomia do 21 ($p=0,309$) (Tabela 9).

A comparação das concentrações de FOL dosado no LQAM entre os grupos de trissomias do 13, 18 e 21 não apresentou diferença. Entre a trissomia do 13 e trissomia do 18, $p = 0,371$; entre trissomia do 13 e trissomia do 21, $p = 0,083$; entre trissomia do 18 x trissomia do 21, $p = 0,182$ (Tabela 9).

4.2.3 Vitamina B12

Quando comparadas as concentrações sanguíneas de VB12 entre os grupos deste estudo, foi verificada diferença entre os grupos GMF e NG ($p= 0,0001$). Entre os grupos GC e NG ($p= 0,052$); GMF e GC ($p= 0,131$) não houve diferença desse micronutriente (Figura 34). No grupo GMF temos um ponto outlier, referente a uma dosagem de VB12 igual a 2000 pg/mL. Pela análise do prontuário dessa participante não foi possível obter nenhuma informação referente a suplementação vitamínica. Na ultrassonografia, o feto apresentava RCIU, além da presença de cisto do plexo coroide bilateral e foco ecogênico intracardiaco (“golf ball”).

Figura 34. Comparação entre as concentrações sanguíneas de vitamina B12 entre os grupos analisados.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

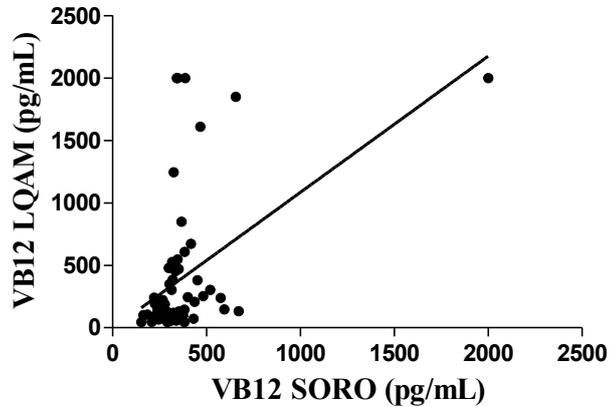
Notas: GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes; VB12: vitamina B12.

Teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

A comparação das concentrações de VB12 no sangue das gestantes do grupo GMF, subdividido em grupo com cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias, não apresentou diferença (Tabela 8). Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p= 0,502$), cariótipo normal e trissomia do 18 ($p= 0,553$) e cariótipo normal e trissomia do 21 ($p= 0,885$).

Em relação a correlação entre as concentrações de VB12 no sangue e no LQAM, foi encontrada correlação positiva ($p < 0,0001$, $r = +0,477$) (Figura 35).

Figura 35. Correlação entre as concentrações de vitamina B12 no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: Correlação de Spearman. VB12 (vitamina B12) ($p < 0,0001$, $r = +0,477$).

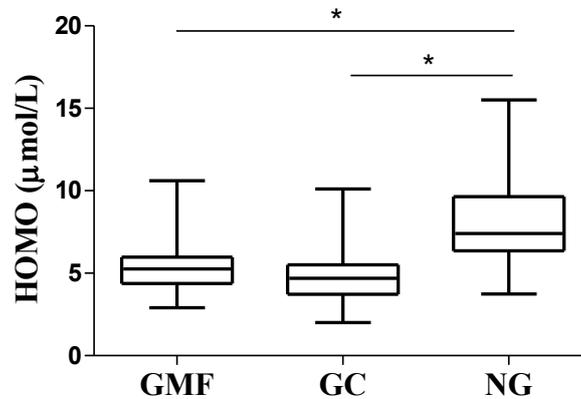
Na comparação entre os marcadores dosados no LQAM de gestantes do grupo GMF, subdividido conforme o cariótipo fetal, cariótipo normal e cariótipo com trissomias, as concentrações de VB12 não apresentaram diferença. Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p = 0,487$), cariótipo normal e trissomia do 18 ($p = 0,209$) e cariótipo normal e trissomia do 21 ($p = 0,886$) (Tabela 9).

A comparação das concentrações de VB12 dosadas no LQAM entre os grupos de trissomias do 13, 18 e 21 não apresentou diferença. Entre a trissomia do 13 e trissomia do 18, $p = 0,250$; entre a trissomia do 13 e trissomia do 21, $p = 0,200$; entre a trissomia do 18 x trissomia do 21, $p = 0,497$ (Tabela 9).

4.2.4 Homocisteína

Quando comparadas as concentrações sanguíneas de HOMO entre os grupos deste estudo, foi observada diferença entre o grupo GC e NG ($p < 0,0001$) e entre GMF e NG ($p < 0,0001$), já entre os grupos GMF e GC ($p = 0,054$) não foi observada diferença (Figura 36).

Figura 36. Comparação entre as concentrações sanguíneas de homocisteína entre os grupos analisados.



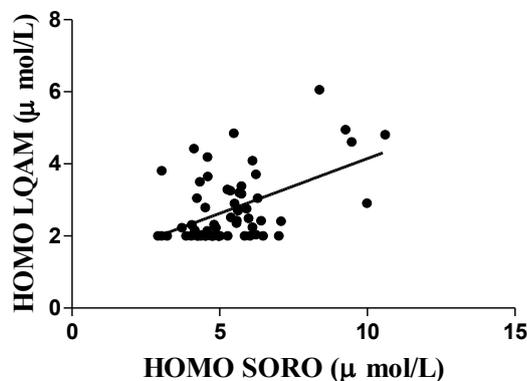
Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: GMF: gestantes com alteração fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes; HOMO: Homocisteína. Teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

A comparação das concentrações de HOMO no sangue das gestantes do grupo GMF, subdividido em grupo com cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias, não apresentou diferença (Tabela 8). Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p = 0,705$), cariótipo normal e trissomia do 18 ($p = 0,810$) e cariótipo normal e trissomia do 21 ($p = 0,631$).

Em relação a correlação entre as concentrações de HOMO no sangue e no LQAM, foi encontrada correlação positiva ($p < 0,0001$, $r = +0,477$) (Figura 37).

Figura 37. Correlação entre as concentrações de homocisteína no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: Correlação de Spearman. HOMO (homocisteína) ($p = 0,003$, $r = +0,372$).

Na comparação entre os marcadores dosados no LQAM de gestantes do grupo GMF, subdividido conforme o cariótipo fetal, cariótipo normal e cariótipo com trissomias, as concentrações de HOMO não apresentaram diferença. Cariótipo normal e trissomia do 13 ($p=1,000$), cariótipo normal trissomia do 18 ($p=0,604$) e cariótipo normal trissomia do 21 ($p=0,323$) (Tabela 9).

A comparação das concentrações de HOMO dosadas no LQAM entre os grupos de trissomias do 13, 18 e 21 não apresentou diferença. Entre a trissomia do 13 e trissomia do 18, $p=0,759$; entre a trissomia do 13 e trissomia do 21, $p=0,350$; entre a trissomia do 18 x trissomia do 21, $p=0,703$ (Tabela 9).

Tabela 8. Comparação entre as concentrações sanguíneas dos marcadores bioquímicos em gestantes do grupo GMF com cariótipo fetal normal e cariótipo fetal com trissomias.

Analito	CN x Trissomia do 13	CN x Trissomia do 18	CN x Trissomia do 21
	p	p	p
Alfafetoproteína	0,614	0,207	0,964
Vitamina B12	0,502	0,553	0,885
Folato	0,256	0,907	0,584
Homocisteína	0,705	0,810	0,631

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho

Notas: CN: cariótipo normal. Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 9. Comparação das concentrações de marcadores bioquímicos no líquido amniótico entre cariótipo fetal normal e com trissomias e entre as trissomias.

	AFP (ng/mL)	VB12 (pg/mL)	FOL (ng/mL)	HOMO (μ mol/L)
	p	p	p	p
CN x TRI 13	0,080	0,487	0,390	1,000
CN x TRI 18	0,034*	0,209	0,859	0,604
CN x TRI 21	0,580	0,886	0,309	0,323
TRI 13 x 18	0,953	0,250	0,371	0,759
TRI 13 x 21	0,029*	0,200	0,083	0,350
TRI 18 x 21	0,043*	0,497	0,182	0,703

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: CN: cariótipo normal, TRI: trissomia. Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

4.3 MARCADORES DE DANO AO DNA E ALTERAÇÕES NUCLEARES

4.3.1 Quantificação do dano ao DNA pela técnica do cometa

A avaliação de dano ao DNA pela técnica do cometa apresentou escores que variaram de 2 a 212, conforme disposto na tabela 10.

O índice total de dano ao DNA quantificado pela técnica do cometa apresentou diferença entre o grupo GMF e NG ($p = 0,003$), entre GMF e GC ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre o grupo GC e NG nesta técnica (Figura 38).

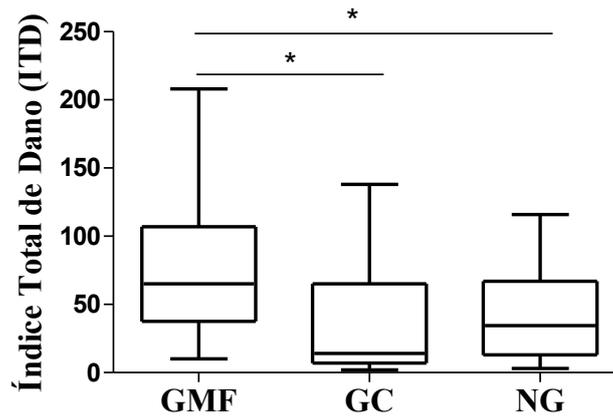
Tabela 10. Frequência de dano ao DNA avaliado pela técnica do cometa, nos grupos analisados.

	Média±DP	Mediana (mínimo-máximo)
Sangue NG	43,58±35,94	34,50 (3 – 116)
Sangue GC	32,63±37,83	14 (2 – 138)
Sangue GMF	74,98±48,73	65 (10 – 208)
LQAM GMF	111,6±59,03	112 (5 – 212)

Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes; LQAM: líquido amniótico.

Figura 38. Índice total de dano ao DNA pela técnica do cometa no sangue.

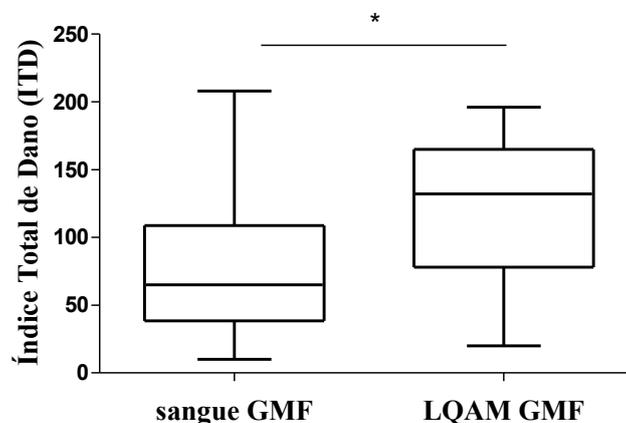


Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes. Teste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Quando comparado o índice total de dano ao DNA entre o sangue e o LQAM do grupo GMF, foi observada diferença ($p = 0,0009$), sendo o índice maior nas amostras do LQAM (Figura 39).

Figura 39. Comparação do índice total de dano ao DNA pela técnica do cometa no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

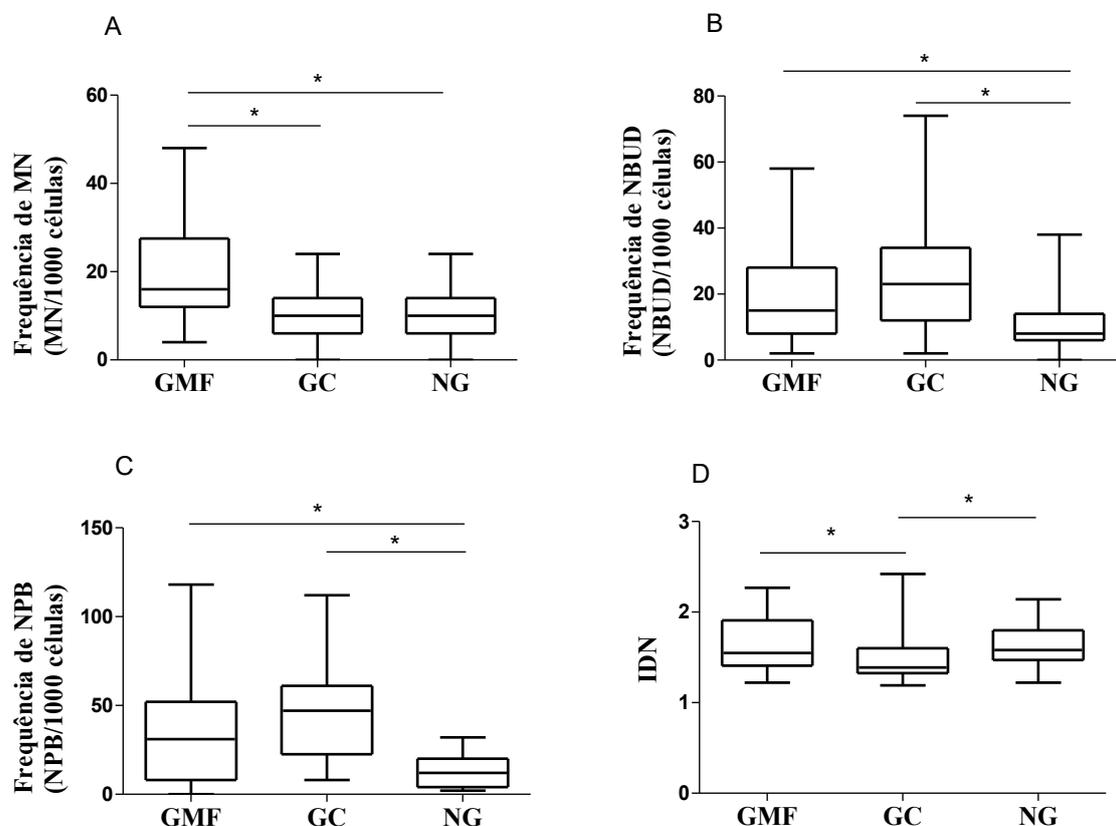
Notas: GMF: gestantes com malformação fetal; LQAM: líquido amniótico. Teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$.

Não foi observada correlação do índice total de dano ao DNA entre o sangue e as células do LQAM do grupo GMF ($p = 0,619$).

4.3.2 Quantificação das alterações nucleares e dano ao DNA e pela técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese (CBMN)

O dano ao DNA quantificado pela técnica CBMN apresentou uma frequência de MN maior no grupo GMF quando comparado ao grupo GC ($p = 0,0003$) e ao grupo NG ($p = 0,0002$). Entre o grupo GC e NG não houve diferença da quantificação de MN ($p = 0,9715$) (Figura 40, A). A mediana da frequência de NBUD diferiu entre GMF e NG ($p = 0,0075$) e entre GC e NG ($p = 0,0001$). Entre o grupo GMF e GC não foi encontrada diferença com relação a presença de NBUD ($p = 0,0535$) (Figura 40, B). A mediana da frequência de NPB foi maior no grupo GMF que no grupo NG ($p = 0,0011$) e no grupo GC que no grupo NG ($p < 0,0001$). Entre o grupo GMF e GC não foi encontrada diferença ($p = 0,0682$) (Figura 40, C). Com relação ao IDN, foi observada diferença entre o grupo GMF e GC ($p = 0,0033$) e entre o grupo GC e o grupo NG ($p = 0,0016$). Entre os grupos GMF e NG não foi observada diferença ($p = 0,6526$) (figura 40, D).

Figura 40. Dano ao DNA quantificado pela técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN).



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

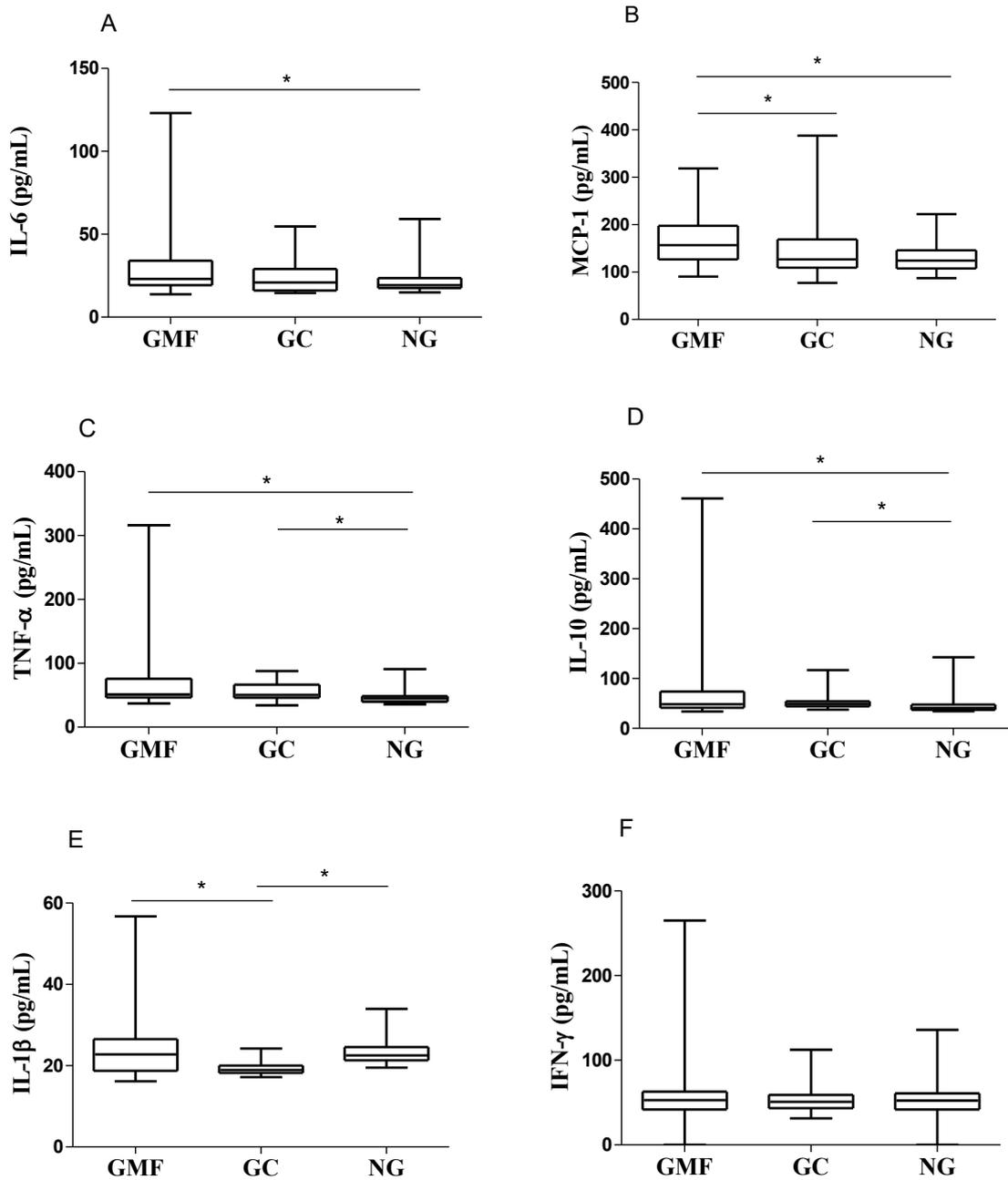
Notas: (A) Frequência de MN; (B) Frequência de NBUD; (C) Frequência de NPB; (D) IDN: Índice de Divisão Nuclear. GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes. Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

4.3.3 Avaliação do Perfil Inflamatório

Considerando a análise do perfil inflamatório, as citocinas quantificadas apresentaram diferentes perfis entre os grupos analisados. As concentrações de IL-6 se apresentaram mais altas no grupo GMF quando comparada ao grupo NG ($p = 0,0163$) (Figura 41, A). Foi encontrada diferença nas concentrações de MCP-1 entre os grupos GMF e GC ($p = 0,0096$) e GMF e NG ($p = 0,0007$) (Figura 41, B). A quantificação de TNF- α apresentou diferença entre GMF e NG ($0,0007$), entre GC e NG ($p = 0,0065$) (Figura 41, C). IL-10 apresentou diferença entre GMF e NG ($p = 0,0072$) e entre GC e NG ($p = 0,0102$) (Figura 41, D). IL-1 β apresentou diferença entre GMF e GC ($p = 0,0025$) e entre GC e NG ($p < 0,0001$)

(Figura 41, E). IFN- γ não apresentou diferença entre os grupos (Figura 41, F). Neste estudo, apenas MCP-1 e IL-1 β apresentaram diferença entre GMF e GC.

Figura 41. Concentrações plasmáticas de IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IFN- γ nos grupos estudados.

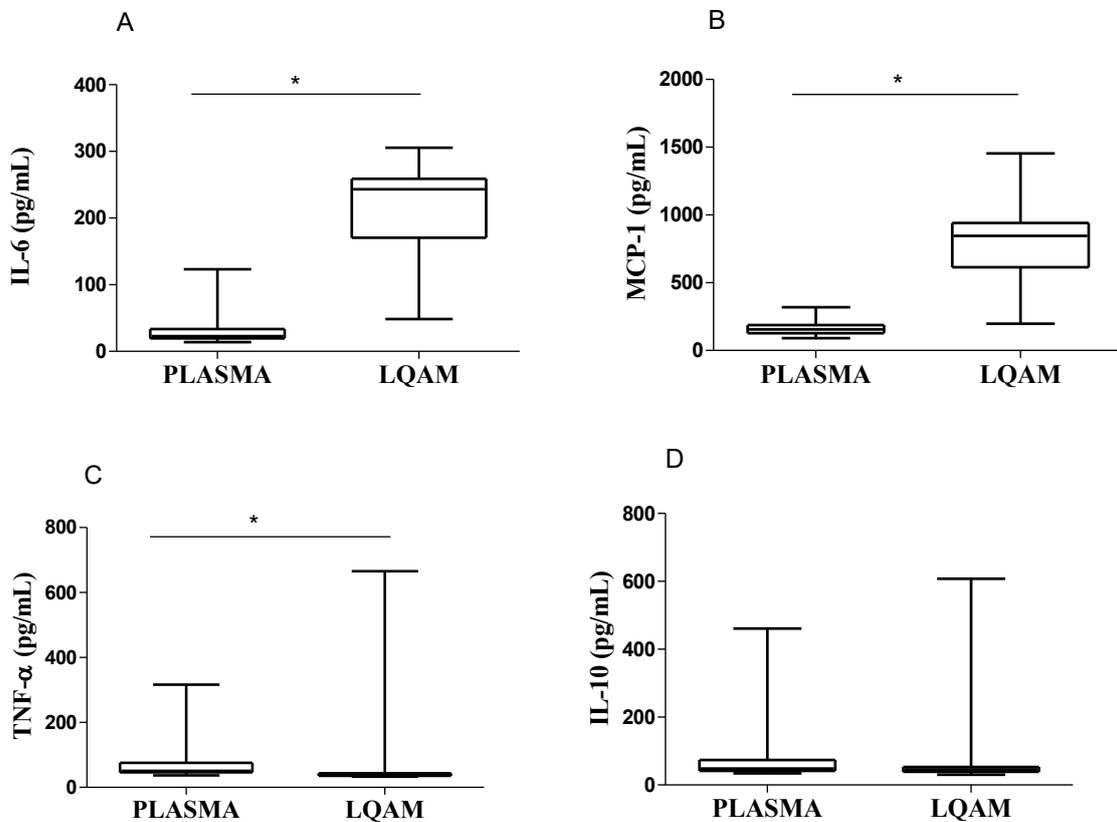


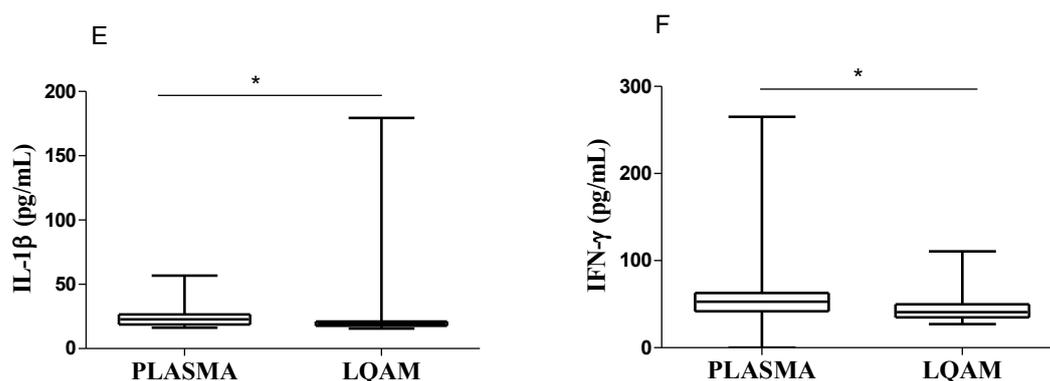
Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho.

Notas: (A) IL-6, (B) MCP-1, (C) TNF- α , (D) IL-10, (E) IL-1 β e (F) IFN- γ . GMF: gestantes com malformação fetal; GC: gestantes controle; NG: não gestantes. Teste Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Comparando as concentrações de citocinas do plasma com as do LQAM das gestantes com malformação fetal foi observada diferença para IL-6 ($p < 0,0001$), MCP-1 ($p < 0,0001$), cujas concentrações se apresentaram maiores no LQAM e para TNF- α ($p < 0,0001$), IL-1 β ($p = 0,0104$) e IFN- γ ($p = 0,0209$) as concentrações se apresentaram maiores no plasma. As concentrações de IL-10 ($p = 0,0516$) não diferiram entre plasma e LQAM (Figura 42).

Figura 42. Comparação entre as concentrações de IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-10, IL-1 β e IFN- γ no plasma e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.





Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: (A) IL-6, (B) MCP-1, (C) TNF- α , (D) IL-10, (E) IL-1 β e (F) IFN- γ . LQAM: líquido amniótico. Teste de Wilcoxon. * p < 0,05.

O grupo GMF foi subdividido em um grupo que apresentava cariótipo normal (CN) e um grupo que apresentava trissomias (incluindo todas as trissomias encontradas neste estudo). As citocinas quantificadas no sangue e no LQAM de cada subgrupo foram comparadas. A comparação entre cariótipos normais e com trissomias, tanto em sangue quanto em LQAM não apresentou diferença para nenhuma das citocinas quantificadas, conforme resultados na Tabela 11.

Tabela 11. Comparação das concentrações de citocinas no sangue e no líquido amniótico entre os subgrupos com cariótipo normal e cariótipo com trissomia do grupo de gestantes com malformação fetal.

Citocina	Cariótipo normal X Cariótipo com trissomia	
	Sangue	LQAM
IL-6	0,5428	0,8697
MCP-1	0,5850	0,8956
TNF- α	0,7550	0,1313
IL-10	0,4445	0,1023
IL-1 β	0,8149	0,3936
IFN- γ	0,4124	0,4614

Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Nota: Teste U de Mann-Whitney.

O grupo das gestantes com malformações fetais foi subdividido de acordo com a idade gestacional e a concentração das citocinas no sangue e no LQAM foi comparada entre os trimestres gestacionais (segundo e terceiro). No sangue, as dosagens de IL-10 foram maiores no segundo trimestre em comparação ao terceiro trimestre ($p= 0,0215$). As demais citocinas dosadas no sangue não diferiram entre os períodos gestacionais. Com relação as citocinas dosadas no LQAM e a comparação entre os trimestres, MCP-1 e IL-10 apresentaram concentrações maiores nas amostras do segundo trimestre ($p < 0,0001$ e $p= 0,0005$, respectivamente). IFN- γ apresentou concentrações maiores no terceiro trimestre ($p = 0,0369$). IL-6, TNF- α e IL-1 β não diferiram entre os períodos gestacionais (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação das concentrações de citocinas no sangue e no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal conforme o período gestacional.

Citocina	Segundo trimestre x Terceiro trimestre	
	p	
	Sangue	LQAM
IL-6	0,9331	0,1712
MCP-1	0,9866	< 0,0001*
TNF- α	0,5570	0,3973
IL-10	0,0215*	0,0005*
IL-1 β	0,6996	0,9797
IFN- γ	0,6881	0,0369*

Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: Teste U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

A correlação de Spearman foi empregada para os dados quantitativos dosados no sangue do grupo GMF. Foi observada correlação positiva entre IL-6 x IDN, IL-1 β x IDN. Entre IL-1 β e NBUD, IDN e NBUD, IDN e NPB foi observada correlação negativa. Entre os marcadores bioquímicos e os marcadores de dano ao DNA não foi observada correlação, conforme dados da Tabela 13.

Tabela 13. Correlação de Spearman para os dados quantitativos obtidos no sangue de gestantes com malformação fetal.

Parâmetros	p	r
IL-6 x IDN	0,034*	+ 0,387
IL-1 β x NBUD	0,023*	- 0,414
IL-1 β x IDN	0,029*	+ 0,400
AFP x COMETA	0,855	- 0,030
VB12 x COMETA	0,121	+ 0,249
FOL x COMETA	0,138	- 0,238
HOMO x COMETA	0,352	- 0,151
AFP x MN	0,129	- 0,213
VB12 x MN	0,496	+ 0,096
FOL x MN	0,225	- 0,171
HOMO x MN	0,184	+ 0,187
AFP x NBUD	0,678	+ 0,059
VB12 x NBUD	0,885	- 0,021
FOL x NBUD	0,133	+ 0,211
HOMO x NBUD	0,088	+ 0,239
AFP x NPB	0,306	+ 0,145
VB12 x NPB	0,124	- 0,216
FOL x NPB	0,976	- 0,004
HOMO x NPB	0,617	+ 0,071
IDN x MN	0,842	+ 0,027
IDN x NBUD	< 0,0001*	- 0,505
IDN x NPB	0,047*	- 0,266

Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: Correlação de Spearman. IDN: índice de divisão nuclear; AFP: alfafetoproteína, VB12: vitamina B12; FOL: folato; HOMO: homocisteína; MN: micronúcleo, NBUD: bud nuclear; NPB: ponte nucleoplasmática.

*p<0,05.

A correlação de Spearman foi empregada para os dados quantitativos encontrados no líquido amniótico do grupo GMF e foi observada correlação positiva entre MCP-1 x AFP, IL-10 x AFP, IL-10 x VB12, IG x HOMO, IFN- γ x IG. Correlação negativa foi encontrada entre

IG x AFP, IG x VB12, IG x FOL, IFN- γ x FOL, MCP-1 x IG, IL-10 x IG. Entre os marcadores bioquímicos e o índice total de dano (ITD) pela técnica do cometa, não foi observada nenhuma correlação. Dados Tabela 14.

Tabela 14. Correlação de Spearman para os dados quantitativos obtidos no líquido amniótico de gestantes com malformação fetal.

Parâmetros	p	r
IG x AFP	< 0,0001*	- 0,820
MCP-1 x AFP	< 0,0001*	+ 0,439
IL-10 x AFP	0,002*	+ 0,361
IG x VB12	0,012*	- 0,301
IL-10 x VB12	0,040*	+ 0,249
IG x FOL	0,001*	- 0,394
IFN- γ x FOL	0,024*	- 0,272
IG x HOMO	< 0,0001*	+ 0,469
MCP-1 x IG	0,007*	- 0,327
IL-10 x IG	0,007*	- 0,322
IFN- γ x IG	0,020*	+ 0,282
AFP x COMETA	0,139	- 0,208
VB12 x COMETA	0,688	- 0,057
FOL x COMETA	0,342	+ 0,135
HOMO x COMETA	0,291	+ 0,149

Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho.

Notas: AFP: alfafetoproteína, VB12: vitamina B12; FOL: folato; HOMO: homocisteína; IG: idade gestacional.

Correlação de Spearman. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A realização do pré-natal representa papel fundamental na prevenção e/ou detecção precoce de doenças, tanto maternas como fetais, permitindo um desenvolvimento saudável do embrião/feto e reduzindo os riscos para a gestante. O acompanhamento pré-natal do primeiro trimestre permite classificar a gestação quanto ao seu risco, que pode ser baixo ou alto. Dentre os fatores analisados para inserção no grupo de alto risco estão aqueles relacionados às condições prévias da gestante, fatores relacionados à história reprodutiva anterior e fatores relacionados à gestação atual, como RCIU, polidrâmnio ou oligodrâmnio, gemelaridade, malformações fetais ou arritmia fetal e distúrbios hipertensivos da gestação (BRASIL, 2012). Todas as integrantes do grupo GMF neste estudo foram classificadas como pertencentes ao grupo de alto risco, conforme avaliação do pré-natal de primeiro trimestre.

A ultrassonografia é uma importante ferramenta durante a triagem pré-natal. Além de permitir verificar a presença de malformações fetais, também é empregada para avaliar a TN, cujo aumento configura um importante rastreio positivo para alterações cromossômicas (ROSSI; PREFUMO, 2013), condição essa presente em muitas gestantes desta pesquisa. O aumento da TN por si só não é uma anormalidade, mas é um risco fator de risco para anormalidades e parece estar aumentado em 4,4% dos fetos euploides (SNIJDERS et al., 1998). Assim, duas participantes deste estudo, que apresentaram apenas TN aumentada na ultrassonografia, foram excluídas da pesquisa.

A aneuploidia é uma anormalidade cromossômica, que se caracteriza pela presença de um cromossomo extra ou pela falta de um cromossomo, causada por erros durante o processo de divisão celular meiótica (CIMINI; DEGRASSI, 2005). As anormalidades cromossômicas são consideradas importantes causas de defeitos congênitos e deficiência intelectual (HU et al., 2019). A aneuploidia em oócitos depende da idade materna, com maior incidência em mulheres muito jovens (menos de 20 anos) e naquelas com idade mais avançada (mais de 35 anos). A determinação do cariótipo fetal é indicada em casos de rastreio positivo para aneuploidias, gestantes com mais de 35 anos de idade, histórico familiar de doenças genéticas, mulheres com histórico prévio de fetos com anomalias e ultrassonografia indicando malformação fetal. Assim, a idade é o principal fator que determina a forma da curva de fertilidade humana (CHANG et al., 2012; GHI et al., 2016; SERIN, 2013; GRUHN et al., 2019). Neste estudo, a mediana da idade das gestantes cujos

fetos apresentavam trissomias foi de 37 anos, fator que corrobora o descrito na literatura. Erros na segregação cromossômica durante a meiose, em mulheres em idade avançada, contribuem para produção de oócitos com número de cromossomos incorreto (ALLEN et al., 2009; BENN et al., 2015; HASSOLD; HUNT, 2001; NICOLAIDES; SEBIRE; SNIJDERS, 2004; OGILVIE et al., 2005; SHI et al., 2021). Os defeitos meióticos associados à idade observados em oócitos de mulheres mais velhas podem estar relacionados ao estresse oxidativo, resposta incorreta ao dano ao DNA e recombinação dos telômeros, levando a abortos espontâneos e infertilidade (KEEFE; LIU, 2009; LIU et al., 2007).

A presença de aneuploidia desencadeia alterações fisiológicas como alteração do crescimento celular, instabilidade genômica e resposta a interferons (CHUNDURI; STORCHOVÁ, 2019). Dentre as aneuploidias autossômicas, a trissomia do 21 (síndrome de Down), trissomia do 18 (síndrome de Edwards) e trissomia do 13 (síndrome de Patau) são as anormalidades cromossômicas mais comuns que afetam gestações em curso (ALBERMAN; MUTTON; MORRIS, 2012; LOANE et al., 2013; SKRZYPEK; HUI, 2017). Essas três aneuploidias foram as alterações cromossômicas com maior incidência nesta pesquisa. Todos os fetos diagnosticados com trissomia do 21 neste estudo eram do sexo masculino, corroborando outros achados (ALBERMAN; MUTTON; MORRIS, 2012; HUETHER et al., 1996; MUTTON; ALBERMAN; HOOK, 1996; NIELSEN et al., 1981; VERMA; HUQ, 1987). Além dessas trissomias, também foi determinado um cariótipo com trissomia do 22 e um com cromossomo marcador. A trissomia do 22, encontrada em uma única gestante que compôs o grupo GMF, consiste em uma síndrome extremamente rara, com uma incidência estimada variando de 1 em 30.000 a 1 em 50.000 nascimentos. No caso de abortos espontâneos, é a segunda trissomia autossômica mais comum e geralmente menos que 1 de 30.000 fetos nascem vivos (HEINRICH et al., 2012).

Dois fetos apresentaram cromossomos com alteração estrutural do tipo inversão. O feto com inversão do cromossomo 9 apresentava cardiopatia complexa. A inversão pericêntrica do cromossomo 9 [(inv9)(p11q12)] é a forma mais comum de inversão encontrada nos cromossomos humanos, ocorre em 1%–1,65% da população em geral (CHEONG et al., 1997). Essa inversão foi reconhecida como uma variante normal, geralmente sem efeito fenotípico (SAMONTE et al., 1996). Contudo, casos de retardo mental e anomalia congênita associados a essa alteração são descritos na literatura (DANA; STOIAN, 2012; ŠÍPEK et al., 2015).

A inversão do cromossomo 1, [inv (1)(p11q12)], parece comprometer a fertilidade masculina, mas não a feminina, e o mecanismo subjacente a esta diferença merece um estudo mais aprofundado (LI et al., 2020; LUO et al., 2014). Neste estudo, o feto com essa inversão era do sexo feminino.

As alterações como presença de heterocromatina, satélite e haste do satélite aumentados encontrados em alguns cariótipos são características variáveis normais dos cromossomos humanos, sem consequências fenotípicas (MALUF; RIEGEL, 2011).

Os fetos que foram diagnosticados com as trissomias do 13 e do 18 apresentavam múltiplas anomalias congênitas, reforçando as descrições da literatura (CAREY, 2021; SPRINGETT et al., 2015).

A TN aumentada, defeitos cardíacos congênitos e osso nasal ausente ou hipoplásico são achados ultrassonográficos bem característicos da trissomia 21 (HYETT et al., 1996; NICOLAIDES et al., 2005; SONEK; NICOLAIDES, 2002). Essas foram as principais alterações observadas nos fetos com trissomia do 21 neste estudo.

Além da ultrassonografia, a dosagem sanguínea de marcadores bioquímicos como β -HCG, PAPP-A, AFP, dentre outros, pode ser preditivo para a presença de DTN e aneuploidias (KAGAN et al., 2008). Um marcador importante, abordado na literatura, e sugestivo de alteração fetal conforme as concentrações detectadas é a AFP. As concentrações de AFP no soro de gestantes são comumente usadas como preditor de complicações na gestação tais como RCIU, pré-eclâmpsia e descolamento prematuro da placenta, bem como triagem para presença de DTN e trissomias (PUNTACHAI et al., 2015; THOMAS; BLAKEMORE, 1990; ZARZOUR et al., 1998). A fonte primária de AFP encontrada no soro materno durante a gestação é aquela proveniente do LQAM (BENDON, 1991). A transferência desse analito para o sangue materno se dá por meio de processos multifatoriais envolvendo a placenta e a parede uterina (BERKELEY; KILLACKEY; CEDERQVIST, 1983).

Aneuploidias autossômicas costumam apresentar concentrações reduzidas de AFP no sangue materno, frequentemente causadas pelo desenvolvimento anormal da função hepática e renal fetal, juntamente com transporte placentário prejudicado (VAN LITH et al., 1991). Por outro lado, já foi demonstrada redução desta glicoproteína apenas nos casos de trissomia do 21 (WRIGHT et al., 2014). O transporte placentário defeituoso de AFP é observado na trissomia do 21, assim, as concentrações desta glicoproteína são baixas no soro materno, apesar da produção fetal ser normal (NEWBY et al., 1996; GLOWSKA-CIEMNY et

al., 2022). Neste estudo, quando comparados os resultados da dosagem de AFP no sangue entre os grupos GMF e GC não foi observada diferença. A comparação de AFP no sangue de gestantes com cariótipos fetais normais e com trissomias também não apresentou diferença. A heterogeneidade dos grupos de gestantes deste trabalho, tanto no que se refere aos tipos de malformações quanto à idade gestacional, pode ter contribuído para a ausência de diferença nas análises.

A correlação negativa entre a dosagem de AFP no sangue e no LQAM encontrada neste trabalho está de acordo com alguns dados da literatura que indicam um pico de AFP no LQAM em torno de 10 semanas de gestação, decaindo gradualmente até o parto (BLOHM et al., 1998) e um aumento das concentrações séricas maternas até atingir um pico em torno de 32 semanas (MIZEJEWSKI, 2003; NEWBY et al., 2005). Por outro lado, esta correlação negativa difere de alguns estudos realizados com mulheres em idade gestacional entre 12 e 17 semanas e sem a presença de malformações fetais, nos quais não foi observada correlação deste analito entre os dois tipos de amostras, sugerindo que nas semanas iniciais, a placenta, o âmnio ou ambos regulam o intercâmbio desta glicoproteína (BARFORD; DICKERMAN; JOHNSON, 1985; BRUMFIELD et al., 1990). Essa divergência pode ser, em partes, explicada pela diferença no intervalo da idade gestacional e pela ocorrência de malformações nas populações estudadas. O aumento absoluto nas concentrações de AFP no soro materno pode ser resultado do aumento no processo de transferência, provavelmente relacionada ao mau funcionamento da placenta, devido a uma isquemia placentária, por exemplo, o que pode acarretar complicações na gestação (SPONG et al., 1997). Um grupo de pesquisadores sugeriu que a razão entre AFP do sangue materno pela AFP no LQAM (AFP soro/AFP LQAM) é capaz de prever com mais acurácia a probabilidade de existirem complicações gestacionais do que as concentrações de AFP sanguíneas isoladas (SHARONY et al., 2016).

As concentrações de AFP no líquido amniótico diminuem cerca de 10% por semana entre a 14ª e a 20ª semana de gestação (CRANDALL et al., 1983). A correlação negativa entre IG e AFP no LQAM, encontrada neste estudo, corrobora esse dado. Somado a isso, quando comparadas as concentrações de AFP no LQAM dos grupos divididos em cariótipo normal (CN) e as trissomias, não foi encontrada diferença entre CN e as trissomias do 13 e do 21. Porém, na comparação entre CN e trissomia do 18 foram observadas concentrações mais elevadas no grupo com esta trissomia. Os fetos do grupo com trissomia do 18 apresentavam DTN e defeitos da parede abdominal. Aumento da concentração de AFP no líquido amniótico

foi relatada no caso de fetos que apresentam DTN aberto, bem como em casos de defeitos da parede abdominal (onfalocele, gastrosquise) (ADINOLFI; ADINOLFI; LESSOF, 1975; CAMERON; MORAN, 2009; CRANDALL; CHUA, 1997; GLOWSKA-CIEMNY et al., 2022; KRANTZ; HALLAHAN; CARMICHAEL, 2016; TUCKER et al., 1992) .

Nelson e Petersen (1985) relataram baixas concentrações de AFP no líquido amniótico em seu estudo envolvendo casos de trissomia do 21, mas não em outras aneuploidias. Foram encontradas baixas concentrações de AFP associadas com trissomia do 21 tanto no soro quanto no LQAM (CUCKLE; WALD; LINDENBAUM, 1984). Para Crandall e colaboradores (1988) a trissomia do 21 é a única aneuploidia associada à redução das concentrações de AFP no LQAM. Para estes pesquisadores, as maiores reduções na AFP são observadas em idades gestacionais inferiores a 18 semanas. Cuckle et al., (1984) sugerem que as concentrações de AFP no LQAM tendem a aumentar com a IG na trissomia do 21 em comparação com o inverso em gestações não afetadas. Neste estudo, a idade gestacional média das gestantes cujos fetos apresentavam trissomia do 21 foi de 23,7 semanas, provavelmente por isso, os dados encontrados não corroboram os da pesquisa de Crandal.

Concentrações menores de AFP foram encontradas na trissomia do 21 quando comparadas com as trissomias do 13 e 18. Isso pode ser justificado pelo fenótipo dessas trissomias, que pode estar acompanhado de malformações, como DTN e onfalocele, que contribuem para o aumento das concentrações desse marcador (CAREY, 2021; IGNACIO RODRIGUEZ et al., 1990). Estudos demonstraram que as concentrações de AFP no LQAM na trissomia do 18 estão próximas dos valores da mediana do grupo controle ou ligeiramente acima (DORAN et al., 1986; MERKATZ et al., 1984; NELSON; PETERSEN, 1985). Outra pesquisa observou que em fetos com trissomia do 18 e ausência de DTN as concentrações de AFP no LQAM eram significativamente reduzidas durante o segundo trimestre, por outro lado, na presença de DTN e onfalocele, um aumento de AFP foi observado (LINDENBAUM et al., 1987). O aumento de AFP na trissomia do 18 pode estar associada a vários defeitos do desenvolvimento em fetos com esta aneuploidia, como múltiplos cistos bilaterais do plexo coróide, fissura labiopalatina e defeito do septo atrial (CHEN et al., 2022, 2022; GLOWSKA-CIEMNY et al., 2022). Além disso, o valor mediano das concentrações de AFP no LQAM diminuiu com o avanço da IG (MERKATZ et al., 1984). Este fato pode justificar as menores concentrações observadas na trissomia do 21, já que a mediana da IG das gestantes com fetos com trissomia do 21 foi maior que das outras trissomias.

Apesar da importância da quantificação da AFP na investigação de malformações fetais, a determinação do cariótipo fetal em líquido amniótico obtido por amniocentese continua sendo o exame padrão para confirmação de diagnóstico de aneuploidias e outras doenças genéticas (BUI, 2007).

Embora as desordens congênitas possam resultar de um ou mais fatores genéticos, infecciosos, nutricionais ou ambientais, muitas vezes é difícil identificar as causas exatas (WHO, 2023). O estado nutricional materno contribui significativamente para o resultado da gestação, sendo o embrião e o feto totalmente dependentes da transferência materno-fetal de nutrientes. Micronutrientes como FOL e VB12 desempenham um papel importante no metabolismo dos ácidos nucleicos, no crescimento celular e fetal, além de serem reguladores da metilação do DNA (MAHAJAN et al., 2019; PISAL et al., 2019).

O FOL é essencial no corpo humano para a biossíntese de purinas e pirimidinas, bem como para os processos de divisão celular e alterações epigenéticas. A metilação do DNA, um componente central da rede epigenética, é alterada em resposta a influências nutricionais e tem duas funções: regular a expressão genética e a estrutura da cromatina (ZENG; CHEN, 2019).

Deficiência de folato nas células pode levar à metilação aberrante do DNA, mutações pontuais e anomalias cromossômicas, como recombinação defeituosa de cromossomos e aneuploidia (COPPEDE, 2009). Por outro lado, a presença de um cromossomo adicional, ou sua perda, pode afetar a taxa global de metilação do genoma (TOLMACHEVA; VASILYEV; LEBEDEV, 2020). Durante a gametogênese e o início da embriogênese, os genomas parentais passam por duas ondas de reprogramação da metilação do DNA. A falha desses processos pode afetar criticamente a estabilidade do genoma, incluindo a segregação cromossômica durante a divisão celular (ZENG; CHEN, 2019).

Durante o período gestacional, a demanda por FOL está aumentada devido as necessidades para o crescimento e desenvolvimento fetal (GREENBERG et al., 2011). A suplementação periconcepcional com ácido fólico mostrou reduzir significativamente o risco de DTN em até 70% (BERRY et al., 1999; CZEIZEL; DUDÁS, 1992; STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1994). Mulheres em dietas restritivas, sem suplementação de ácido fólico, que apresentem nível socioeconômico mais baixo ou tenham acesso limitado a alimentos nutricionalmente adequados e seguro, apresentam maiores chances de terem concentrações séricas baixas de FOL (MORSE, 2012). Neste estudo, as concentrações séricas

de FOL não diferiram entre os três grupos analisados. Os dados indicaram que todas as participantes apresentavam uma dosagem adequada desta vitamina. A ingestão de ácido fólico é facilitada no Brasil devido a fortificação obrigatória de alimentos com esse micronutriente, como determinado pela RDC 304/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002). A introdução da fortificação obrigatória de farinha com ferro e ácido fólico no Brasil foi seguida por uma redução significativa na prevalência de defeitos do tubo neural (LÓPEZ-CAMELO; CASTILLA; ORIOLI, 2010; ORIOLI et al., 2011; SANTOS et al., 2016). No entanto, apesar da adequada suplementação, há muitos casos de malformação fetal, como DTN, em que as gestantes não apresentam deficiência sérica de FOL (KIRKE et al., 1993; YATES et al., 1987). Adicionalmente, de 30 a 50% dos DTN não são evitáveis com ácido fólico, e outros fatores ambientais devem ser considerados, bem como, existe um subgrupo significativo de mulheres que parecem ser resistentes aos efeitos protetores da suplementação de ácido fólico (BLOM et al., 2006; DENNY et al., 2013). A justificativa para este fenômeno pode ser explicada pela variação genética que afeta o acúmulo de FOL celular, incluindo sua absorção, transporte celular, processamento, retenção e degradação (SUH et al., 2001).

Além disso, outra possível explicação para a ocorrência de DTN, mesmo na presença de concentrações adequadas de FOL, é a presença de autoanticorpos contra os receptores de FOL. Na ausência de deficiência sistêmica de FOL, a descoberta de autoanticorpos para o receptor α de folato (RF α), que bloqueiam sua captação, oferece um mecanismo para explicar a resposta ao FOL nesses distúrbios (CABRERA et al., 2008; SEQUEIRA; RAMAEKERS; QUADROS, 2013). Autoanticorpos contra receptores de FOL placentários foram encontrados em mulheres cujas gestações atuais ou prévias tiveram complicações por DTN (SCHWARTZ, 2005). Rothenberg e colegas (2004) reportaram a presença de autoanticorpos para os receptores de FOL em 75% de 12 gestantes cujos fetos foram afetados por DTN, mas somente em 8,3% de gestantes cujos fetos não apresentavam DTN. Esses autoanticorpos se ligam ao receptor de FOL e conseqüentemente inibem a ligação e o transporte desta vitamina da mãe para o feto, comprometendo o desenvolvimento embrionário (TAPARIA et al., 2007). Não foi objeto deste estudo a investigação da ocorrência de polimorfismos genéticos e a presença de autoanticorpos contra receptores de FOL, contudo, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de alguma alteração genética que interfira na disponibilidade desta vitamina nas gestantes que participaram deste estudo.

Uma vez que o FOL entra na placenta pelo receptor, presente na membrana da borda em escova, seu transportador reduzido, presente na membrana basal, medeia seu efluxo da placenta na circulação fetal (GANAPATHY; SMITH; PRASAD, 2004). Pesquisadores observaram que a concentração de FOL é muito mais elevada no soro fetal que a encontrada no soro materno. Isso se deve provavelmente ao transporte ativo dessa vitamina (OBEID et al., 2005). Estudos em animais mostraram a ocorrência de transporte placentário ativo de FOL e que concentrações elevadas são encontradas no cérebro durante o desenvolvimento fetal precoce (YASUDA et al., 2008). Neste estudo não foram mensuradas as concentrações fetais de FOL, contudo, os resultados apresentaram correlação positiva entre as concentrações de FOL no LQAM e no sangue materno, o que sugere a ocorrência de adequado suprimento fetal com esta vitamina.

A ação do FOL está relacionada a mecanismos para a transferência de grupos metil para moléculas envolvidas em processos biológicos, com papel importante no desenvolvimento embrionário inicial (BLANCO et al., 2016; MILLACURA et al., 2017) Como todas as participantes desse estudo encontravam-se no segundo ou terceiro trimestre gestacional (período fetal), nada se pode inferir com relação as concentrações desta vitamina no início da gestação, nem da associação direta da presença de malformação fetal com sua deficiência nos momentos iniciais da gestação.

Da mesma forma, deficiências na utilização e metabolismo do FOL podem resultar de variação genética que afeta a atividade e/ou estabilidade das enzimas metabólicas dependentes do FOL, mas também podem resultar de deficiências secundárias de nutrientes intimamente ligados ao metabolismo do FOL, como VB12 e colina (BEAUDIN; STOVER, 2009). Neste estudo foi encontrada correlação negativa entre as concentrações de FOL no LQAM e a IG. Achado como este também foi encontrado na pesquisa de Dawson e colaboradores (1998).

A comparação das dosagens de FOL do grupo com cariótipo normal e cariótipo com trissomias não apresentou diferença tanto no sangue das gestantes do grupo GMF quanto no LQAM, nesta pesquisa. Há relatos na literatura que o polimorfismo materno do gene 677C→T da enzima MTHFR pode aumentar significativamente a suscetibilidade dos fetos à trissomia do 21 e à trissomia do 18 (GUO et al., 2017; JAMES et al., 1999).

Outra pesquisa, analisando se o polimorfismo MTHFR poderia estar associado a outras trissomias além do cromossomo 21, como trissomia dos cromossomos sexuais,

trissomias autossômicas do 2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22, observou aumento do polimorfismo na enzima MTHFR nas gestantes cujos fetos tinham trissomia do 18, mas não conseguiu identificar quaisquer outras associações significativas. Por outro lado, uma pesquisa avaliando se havia redução na incidência da trissomia do 21 após a inclusão da fortificação dos alimentos com ácido fólico, não encontrou nenhuma diferença no antes e depois da fortificação (RAY et al., 2003). Assim, de modo geral, pelo menos para os cromossomos sexuais e para um conjunto combinado de trissomias autossômicas, os polimorfismos na via do FOL não contribuem significativamente para a não disjunção meiótica humana (HASSOLD et al., 2001).

A deficiência de VB12 (< 200 pg/mL) está associada com biomarcadores de instabilidade genômica e foi postulada como um fator de risco potencial para DTN (KIRKE et al., 1993; WILSON et al., 1999), uma vez que ela atua como um cofator para a metionina sintase no ciclo do FOL. Quando o suprimento de VB12 é baixo, o FOL necessário para a síntese de DNA permanece preso no ciclo de metilação e a replicação celular é prejudicada (MOLLOY et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Dados da literatura trazem a informação que a RCIU tem maior probabilidade de ocorrer em gestantes que apresentam deficiência de VB12 (KUMAWAT; AMOLSING; THAKUR, 2021; MUTHAYYA et al., 2006b). Acredita-se que as concentrações maternas de VB12 durante a gestação estejam intimamente associadas às fetais (MUTHAYYA et al., 2006a; OBEID et al., 2005).

Neste estudo, nenhuma das integrantes do grupo GMF apresentou deficiência desta vitamina e nenhuma delas relatou ser vegetariana. A comparação das concentrações de VB12 foi menor no grupo GMF em relação ao grupo NG. Isso pode ser justificado pelo aumento da demanda desse micronutriente na gestação, onde as concentrações séricas de VB12 e a percentagem de saturação das proteínas de ligação à VB12 diminuem continuamente durante todo o curso gestacional (KOEBNICK et al., 2002). Em um estudo longitudinal, comparando gestantes e não gestantes, as concentrações séricas de VB12 caíram significativamente no final do primeiro trimestre, em uma extensão que provavelmente não pode ser explicada pelo aumento na hemodiluição que ocorre durante esse período (BARTELS; HELLEMAN; SOONS, 1989).

As proteínas transportadoras da placenta modulam a transferência de nutrientes para o feto durante a gestação (BURTON; FOWDEN, 2012). Transcobalamina (TC) e haptocorrina são as principais transportadoras de VB12. A TC se liga a mais de 70% da VB12

transportada pela placenta, em comparação com 10 - 30% na circulação materna (FEDOSOV, 2012; NEXO; HOFFMANN-LÜCKE, 2011; PEREZ-D'GREGORIO; MILLER, 1998). Embora se tenha conhecimento que a placenta produz TC, que pode ser liberada tanto na circulação materno quanto na fetal, os mecanismos e vias de transporte de VB12 do circuito materno para o fetal são desconhecidos (MILLER et al., 1993; SCHNEIDER; MILLER, 2010). Os resultados deste trabalho sugerem não existirem falhas nos mecanismos de transporte, uma vez que as concentrações de VB12 apresentaram correlação positiva entre sangue e LQAM.

Um estudo em ratos observou que a quantidade real de VB12 na placenta aumentou durante a gestação, e a concentração placentária foi maior do que as concentrações plasmáticas maternas e nos tecidos fetais em todos os momentos medidos. A capacidade da placenta de transportar VB12 aumentou durante a gestação e que a etapa limitante da taxa no processo de transporte foi a passagem de VB12 do lado materno para o fetal da placenta ou a transferência da placenta para o plasma fetal (GRABER et al., 1971).

Concentrações maternas de VB12 durante a gestação ou no parto não foram significativamente associadas à expressão de mRNA de TC placentária ou à abundância de proteínas. No entanto, a maior abundância de proteína TC placentária foi associada a concentrações mais elevadas de VB12 no sangue do cordão umbilical (LAYDEN et al., 2016).

As concentrações de VB12 no LQAM de gestantes de fetos com DTN foram medidos em um pequeno número de estudos. Na maioria dos casos, as concentrações foram mais baixas no LQAM de gestações afetadas em comparação com os controles, embora a diferença não tenha alcançado significância em todos os estudos, além disso, a maioria dos estudos contou com um pequeno número amostral (BROUNS et al., 2008; DAWSON; EVANS; VAN HOOK, 1998; ECONOMIDES et al., 1992; GARDIKI-KOUIDOU; SELLER, 2008; STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1995; WEEKES et al., 1992). Em alguns casos, a concentração de VB12 sérica materna estava na faixa normal na presença de redução da mesma no LQAM, sugerindo que a ingestão dietética insuficiente não foi a causa da redução da concentração desta vitamina no feto (ECONOMIDES et al., 1992).

Outro integrante do ciclo do folato com importância descrita no desenvolvimento fetal é a HOMO. Em comparação com mulheres não grávidas, a concentração de homocisteína é menor em gestações normais. Essa redução se deve à hemodiluição causada

pelo aumento do volume sanguíneo e pela elevada taxa de filtração glomerular, bem como pela suplementação com ácido fólico (CIKOT et al., 2001; MURPHY et al., 2002; POWERS et al., 2004). Além disso, o feto em desenvolvimento apresenta aumento da demanda de metionina e isso leva ao aumento da remetilação de HOMO, contribuindo para a redução sérica deste analito (ANDERSSON et al., 1992). A concentração de HOMO diminui durante o início da gestação, atinge seu valor mais baixo durante o segundo trimestre, depois disso, aumenta constantemente durante o final da gestação até alcançar as concentrações do início da gestação (WALKER et al., 1999). Esses achados vão ao encontro dos dados obtidos neste estudo, que mostram uma redução nas concentrações sanguíneas de HOMO nos grupos de gestantes (GMF e GC), quando comparados ao grupo NG.

Embora a HOMO apresente três possíveis vias metabólicas (FINKELSTEIN, 1998), na placenta humana, apenas uma via metabólica parece ser predominante, a via da remetilação em metionina (GAULL; STURMAN; RÄIHÄ, 1972; SOLANKY et al., 2010). A HOMO pode potencialmente ser transportada ou acumular-se dentro do sincitiotrofoblasto. Tal transporte, ao competir com aminoácidos endógenos pela atividade do transportador, poderia ter implicações importantes para o metabolismo e função do sincitiotrofoblasto, bem como para o desenvolvimento fetal (TSITSIOU et al., 2009). Neste estudo, foi observada correlação positiva entre HOMO no sangue e no LQAM, o que sugere um adequado transporte placentário nas gestantes que participaram desta pesquisa.

Além disso, conforme dados da literatura, a redução de VB12 e FOL, associada ao aumento da HOMO são fatores que afetam tanto a saúde materna quanto o desenvolvimento fetal, tendo associação com a ocorrência de pré-eclâmpsia (COTTER et al., 2001), descolamento placentário (OWEN et al., 1997), parto prematuro (RONNENBERG et al., 2002), DTN (MILLS et al., 1995; WENSTROM et al., 2000), defeitos cardíacos congênitos (WENSTROM et al., 2001), síndrome de Down (JAMES et al., 1999), RCIU (LINDBLAD et al., 200; GRANDONE et al., 2006). Porém, neste estudo não se pode inferir que as alterações fetais observadas no grupo de GMF estejam diretamente relacionadas a deficiência dessas vitaminas e consequente aumento da HOMO.

A comparação entre as dosagens sanguíneas de HOMO em GMF subdivididas em cariótipo normal e cariótipo com trissomias não apresentou diferença. Tampouco foi observada diferença nas concentrações de HOMO no LQAM entre as principais trissomias encontradas neste estudo. As concentrações de HOMO neste trabalho não estavam

aumentadas. A ocorrência de hiperhomocisteinemia está associada ao aumento do risco de desordens congênitas, incluindo DTN, defeitos cardíacos e síndrome de Down (IACOBAZZI et al., 2014).

Diversos trabalhos têm relatado o papel do FOL, VB12 e HOMO na estabilidade genômica (FENECH, 1998, 2001, 2012; MASHIYAMA et al., 2004; MILIĆ et al., 2010; MINOZZO et al., 2010). Estes marcadores estão envolvidos em vias metabólicas interligadas, que incluem o ciclo da metionina e do folato, e desempenham importante papel no metabolismo do DNA (ULRICH; REED; NIJHOUT, 2008) A avaliação de marcadores de dano ao DNA pelas técnicas do cometa e CBMN foi uma importante ferramenta no desenvolvimento desta pesquisa. Neste trabalho, embora tenha sido encontrado aumento do dano ao DNA no grupo GMF, tanto pela técnica do cometa (índice de dano ao DNA) quanto pela técnica de CBMN (frequência de MN, NBUD e NPB), não foi verificada correlação entre os marcadores bioquímicos e os marcadores de dano ao DNA, tanto no sangue materno quanto no LQAM, não permitindo atribuir o aumento de dano a redução das concentrações de FOL e VB12 e ao aumento de HOMO.

O dano ao DNA deve ser considerado como um marcador de exposição a agentes prejudiciais. Muitas lesões ao DNA celular são causadas por fontes de radiação natural ou artificial, produtos químicos genotóxicos, exposição endógena a espécies reativas de oxigênio ou como resultado de erros na replicação. No entanto, quase todo dano ao DNA é reparado e, mesmo que ele esteja presente após o processo de replicação, não causa necessariamente mutação (AZQUETA et al., 2020). Sua quantificação é importante na gestação, pois o feto é exposto a uma variedade de agentes ambientais e medicamentos que atravessam a placenta (FURNESS; DEKKER; ROBERTS, 2011). Diversos estudos apresentaram uma correlação significativa entre a frequência de dano ao DNA em mães e nos seus fetos utilizando todas as técnicas comuns mencionadas anteriormente como formas de avaliação (GRUJIĆ et al., 2007; LEVARIO-CARRILLO et al., 2005; LOPE et al., 2009; PEDERSEN et al., 2009; TIAN; ISHIKAWA; YAMAUCHI, 2000).

Neste estudo foi quantificado o dano ao DNA pela técnica do cometa nas células do LQAM, as quais apresentaram alta incidência de dano. Como o LQAM reflete as condições das células fetais, pode-se dizer que foi encontrado aumento do dano ao DNA fetal. Os mecanismos de reparo de DNA têm início nas primeiras 24 horas do período embrionário (MÉNÉZO; DALE; COHEN, 2010). Falhas nesses mecanismos podem ser a possível causa

da ocorrência de malformações fetais (MORAWIEC et al., 2008). Alguns estudos mostraram que indivíduos com trissomia do 21 são caracterizados por apresentarem maior incidência de dano ao DNA em seus linfócitos de sangue periférico quando comparados a indivíduos saudáveis e que o estresse oxidativo contribui para esse fato (MALUF; ERDTMANN, 2001; MORAWIEC et al., 2008; ZANA et al., 2006). Neste estudo, nove fetos apresentaram trissomia do 21, o que pode ter contribuído para o aumento do dano ao DNA encontrado nas células do LQAM.

Os resultados obtidos pela técnica do cometa, indicam uma alta incidência de efeitos genotóxicos em mulheres gestantes com malformação fetal e nos seus fetos, de acordo com os resultados obtidos a partir do sangue e LQAM neste estudo, contudo, não foi encontrada correlação entre o dano observado nas células sanguíneas e o das células do LQAM. Durante a execução do protocolo da técnica do cometa, houve perda do material de algumas lâminas, devido ao desprendimento da camada de agarose, o que pode ter comprometido a análise estatística referente a correlação. Um trabalho do nosso grupo de pesquisa encontrou correlação entre dano ao DNA avaliado pela técnica do cometa entre recém-nascidos e suas mães, empregando como material o sangue de cordão e sangue periférico, respectivamente (DA CORREGGIO et al., 2021).

Os resultados obtidos pela técnica do cometa, neste estudo, permitem questionar se é a presença de alguma malformação que leva ao aumento do dano ao DNA, por contribuir para um maior desequilíbrio na capacidade de reparo, ou se o aumento de dano ao DNA favorece a ocorrência de malformação.

Alterações nucleares observadas pela técnica de CBMN são uma importante ferramenta na avaliação do dano ao DNA (FENECH, 2006). A presença de MN em linfócitos está significativamente aumentada em mulheres que desenvolvem pré-eclampsia e/ou RCIU antes do aparecimento de sinais ou sintomas clínicos, em comparação com mulheres com resultados normais de gestação (FENECH, 2011; FURNESS et al., 2010; POTDAR et al., 2009). Um estudo mostrou correlação positiva entre a frequência de MN no sangue periférico dos pais e o sangue do cordão umbilical fetal, sugerindo que fatores genéticos e ambientais compartilhados são importantes na determinação da frequência de MN no feto (LOPE et al., 2009). Acúmulo de MN tem sido extensivamente usado como biomarcador de estresse genotóxico e instabilidade genética em uma grande variedade de modelos humanos e não humanos (FENECH et al., 2011; HAYASHI, 2016). Esses resultados estão de acordo os

encontrados neste estudo, que mostrou maior frequência de MN em GMF quando comparada aos grupos controles. Na avaliação dos outros marcadores de dano citogenético (NBUD e NPB) foi encontrada maior frequência nos dois grupos de gestantes, quando comparadas ao grupo NG. Apesar dos três tipos de alterações nucleares detectadas pela técnica de CBMN (MN, NBUD e NPB) serem considerados biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica, cada marcador desses tem origem em diferentes mecanismos moleculares. A presença de MN está associada a quebra ou perda cromossômica completa, enquanto a presença de NBUD e NPB está relacionada a erros nos mecanismos de reparo (Fenech, 2007). O aumento de MN no grupo GMF pode estar relacionado ao fato deste grupo ser composto por gestantes que apresentavam alterações cromossômicas. Assim, pode-se inferir que os mecanismos de reparo não diferem entre os dois grupos de gestantes que compuseram este estudo. Um fator importante de ser mencionado, é que até o presente, a técnica de CBMN não foi padronizada para ser realizada em células do LQAM, o que de certa forma restringe as metodologias para avaliar dano ao DNA neste material.

O Índice de divisão nuclear (IDN) é a medida da citotoxicidade geral e é um marcador de proliferação celular. A lógica por trás do IDN é que as células com maior dano cromossômico têm menos probabilidade de entrar em divisão celular ou a morte celular ocorre antes da divisão celular (IONESCU et al., 2011). Esse achado pode ser demonstrado neste estudo pela correlação negativa entre a frequência de NBUD e NPB com IDN, também pelo maior IDN no grupo NG comparado ao grupo GC. O maior IDN em GMF comparado a GC pode estar relacionado ao aumento do processo inflamatório encontrado em gestantes com malformação fetal. Estudos demonstraram que o processo inflamatório estimula a divisão celular (BRADLEY JR.; PARR; SHARKEY, 1997; KIRALY et al., 2015), o que pode ser observado neste estudo pela correlação positiva dos marcadores pró-inflamatórios, IL-6 e IL-1 β com o IDN.

Sabendo que o curso normal da gestação é acompanhado por mudanças no perfil inflamatório (MOR, 2008; PALM et al., 2013; ROMERO et al., 2008), e que este tem correlação com o aumento do estresse oxidativo (DENNERY, 2007) e favorecimento do dano ao DNA (FURNESS; DEKKER; ROBERTS, 2011; KAY et al., 2019; PÁLMAI-PALLAG; BACHRATI, 2014), as análises sequenciais deste trabalho se basearam na avaliação de marcadores inflamatórios e sua correlação com marcadores de dano ao DNA nos grupos estudados.

O processo inflamatório na interface materno-fetal é fundamental para uma implantação bem-sucedida e uma gestação a termo (CHALLIS et al., 2009; KOCH; PLATT, 2007). As citocinas desempenham um papel importante na manutenção da gestação, onde o adequado resultado para o desenvolvimento fetal está correlacionado com a produção de citocinas Th2 e a rejeição fetal com Th1 (VASSILIADIS et al., 1998).

Dados da literatura referentes ao papel das citocinas durante a gestação normal apresentam resultados conflitantes. Alguns estudos relataram aumento das concentrações sanguíneas de TNF- α e IFN- γ com a idade gestacional (CHRISTIAN; PORTER, 2014; KRAUS et al., 2010; VASSILIADIS et al., 1998). Enquanto outros, não encontraram nenhuma mudança significativa (COUSSONS-READ; OKUN; NETTLES, 2007; CURRY et al., 2008; VASSILIADIS et al., 1998) ou observaram redução nas concentrações (KRAUS et al., 2010; STOKKELAND et al., 2019). Neste estudo, também foi observada a mesma variabilidade de resultados. Ambos os grupos de mulheres gestantes apresentaram um aumento de TNF- α , por outro lado, as concentrações de IFN- γ não diferiram entre os grupos desta pesquisa.

Outro estudo observou aumento significativo de IL-6 durante a gestação e esses resultados permaneceram elevados no período pós-parto, e nenhuma mudança no perfil de TNF- α foi observada (PALM et al., 2013). A citocina IL-1 β apresentou curva de concentração em forma de U durante o curso da gestação normal, com concentrações maiores no início da gestação e no pós-parto (CHRISTIAN; PORTER, 2014).

As concentrações de citocinas pró-inflamatórias aumentam com a segregação cromossômica incorreta em células humanas e murinas (SANTAGUIDA et al., 2017). A presença de cromossomo extra parece predispor os portadores à lesão oxidativa que começa no útero, como resultado da carga genética, como observado no caso da presença de três cópias do cromossomo 21 (PERRONE et al., 2007). Isso pode ser resultado do estresse celular induzido pela aneuploidia que, por sua vez, induz vigilância imunológica contra células aneuploides (LI; ZHU, 2022). Também foi demonstrado que erros de segregação cromossômica levam ao estresse de replicação e danos ao DNA, ocasionando instabilidade genômica, e que as células com alterações cromossômicas estruturais e numéricas complexas exibem características de senescência e produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (MOGNATO; BURDAK-ROTHKAMM; ROTHKAMM, 2021; SANTAGUIDA et al., 2017b; WILHELM; SAID; NAIM, 2020). Baseado nesta informação, pode-se dizer que a

presença de 43,27% dos fetos com aneuploidia neste estudo corroboram o aumento do processo inflamatório, como observado nas concentrações sanguíneas de MCP-1 e IL-1 β no GMF em relação ao grupo GC. Contudo, a análise comparativa entre cariótipos normais e cariótipos com a trissomias, das gestantes do grupo GMF, não apresentou diferença tanto na comparação das citocinas do sangue quanto nas dosagens no LQAM neste estudo. Esse fato pode estar relacionado a heterogeneidade com relação as malformações encontradas no grupo GMF.

Quando analisado o perfil de citocinas pró-inflamatórias, um aumento geral foi observado nos dois grupos de gestantes quando comparado ao grupo de NG, neste trabalho. A comparação entre a concentração de citocinas no sangue e no LQAM de gestantes com malformação fetal apresentou concentrações de IL-6 e MCP-1 maiores no LQAM, enquanto as citocinas TNF- α , IL-1 β e IFN- γ apresentaram maiores concentrações plasmáticas. A citocina IL-10 não apresentou diferença entre as duas amostras analisadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Chow e colaboradores (2008) que avaliaram as concentrações de diferentes citocinas no LQAM e sangue materno no início do segundo trimestre gestacional. No LQAM foram encontradas concentrações de cinco citocinas (IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, IL-1ra) mais elevadas que as concentrações séricas maternas. A concentração de 12 citocinas (eotaxin, IFN- γ , IL-9, IL-12, IL-15, IL-17, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α , VEGF, PDGF bb) se mostrou mais elevada no soro materno em comparação com o LQAM. Muitas citocinas estão presentes no segundo trimestre no LQAM, mas suas concentrações variam. Isso torna difícil detectar diferenças entre gestações normais e patológicas (HEIKKINEN et al., 2001). O perfil de citocinas no LQAM demonstrou ser indicativo de condições patológicas, como infecção viral ou bacteriana, bem como trabalho de parto prematuro e pré-eclampsia (ESPLIN et al., 2005; GHIDINI et al., 1997; MALAMITSI-PUCHNER et al., 2006; NAKABAYASHI et al., 1998; SUZUKI et al., 2006; YOON et al., 1995). Normalmente, TNF- α não é detectada no LQAM durante o segundo e terceiro trimestre, mas é expressa em condições patológicas, como infecção intrauterina ou durante o parto fisiológico (FORTUNATO; MENON; LOMBARDI, 2002; ROMERO et al., 1992, 2004).

Com relação a comparação da concentração das citocinas de acordo com o período gestacional, no sangue materno, apenas IL-10 apresentou diferença neste estudo, sendo as maiores concentrações encontradas no grupo pertencente ao segundo trimestre, período

reconhecido por ser um estágio anti-inflamatório associado ao crescimento fetal (ERLEBACHER, 2013; SAITO et al., 2010). Na avaliação do perfil inflamatório, no sangue de gestantes normais, nos diferentes estágios da gestação, foi observado aumento de IL-6 após o primeiro trimestre, IL-10 estava presente de maneira constante nos dois primeiros trimestres, apresentando pico de produção durante o trabalho de parto, e aumento constante de IFN- γ após o primeiro trimestre foi observado. Já o TNF- α apresentou uma produção estável nos 3 estágios da gestação (VASSILIADIS et al., 1998).

Hanna e colaboradores (2000) descreveram que em gestações normais os tecidos placentários no primeiro e segundo trimestre gestacional expressam predominantemente IL-10, enquanto IFN- γ apresenta baixa detecção durante o curso da gestação.

Neste estudo, quando comparadas entre o segundo e o terceiro trimestre gestacional, as dosagens de citocinas no LQAM, foram observadas algumas diferenças, MCP-1 e IL-10 estavam aumentadas no segundo trimestre em comparação ao terceiro e IFN- γ , que apresentou maiores concentrações no grupo do terceiro trimestre. O estudo de Weissenbacher e colaboradores (2012), investigando dentro de uma ampla faixa de IG semelhante a este estudo (15^a a 41^a semana), encontrou no LQAM concentrações elevadas de IL-4, TNF- α , GRO- α e MIP1- β e redução das concentrações de IL-10 e IL-12 no segundo trimestre em comparação ao terceiro trimestre. A diferença entre ambas as pesquisas é que o estudo citado analisou apenas LQAM cujos fetos não apresentavam nenhuma malformação.

No que se refere a correlação entre perfil inflamatório e IG no LQAM foram observadas correlações negativas com IL-10 e MCP-1 e correlação positiva com IFN- γ . É justificável a redução de IL-10 com o aumento da IG, pois o terceiro trimestre gestacional é caracterizado pelo predomínio do processo inflamatório. Com relação a correlação negativa entre MCP-1 e IG, esse dado corrobora com os estudos que observaram redução desta citocina no decorrer do curso gestacional (POLARI et al., 2018; STOKKELAND et al., 2019).

Estudos recentes reportaram que a ativação da resposta pró-inflamatória está relacionada com a presença de micronúcleos do DNA no citoplasma (HARDING et al., 2017; MACKENZIE et al., 2017). Há uma evidência substancial de que o DNA do MN pode ser detectado pelo sistema imunológico inato via GMP-AMP cíclico sintase (cGAS), o qual gera monofosfato de guanosina-adenosina cíclico (cGAMP), que ativa o estimulador de genes de interferon (STING) e causa expressão de interferons mediada por IRF3 e NF κ B que, por sua vez, induzem a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (DE OLIVEIRA MANN;

KRANZUSCH, 2017; MACKENZIE et al., 2017; SPEKTOR; UMBREIT; PELLMAN, 2017).

A inflamação induzida não resolvida pode subsequentemente aumentar o estresse oxidativo e agravar ainda mais a instabilidade cromossômica, resultando em um ciclo vicioso de formação de MN, NBUD e NPB, hipermutação e aumento da inflamação (FENECH, 2020).

Neste estudo, uma correlação negativa foi encontrada entre IL-1 β e a frequência de NBUD. Entre os outros marcadores de dano citogenético (MN e NPB) não foi verificada correlação com marcadores inflamatórios. Isto pode ser explicado pelo fato da maioria das amostras inseridas nesta pesquisa ser composta por gestantes que estavam no segundo trimestre gestacional, que se caracteriza pelo predomínio do perfil anti-inflamatório (DEKEL et al., 2014; MOR, 2008), justificando assim a redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β .

Vesce e colaboradores quantificaram IL-6 e IL-8 no líquido amniótico e no plasma materno em gestantes com anormalidades cromossômicas e em gestantes sem anormalidades. Eles observaram um aumento das concentrações de IL-6 e redução de IL-8 no líquido amniótico de gestantes que tinham fetos com cariótipos anormais quando comparados àquelas cujo cariótipo fetal era normal e redução das concentrações de IL-6 no plasma de gestantes com malformação fetal (Vesce et al., 2002). Nesta pesquisa, foi observado aumento de IL-6 no LQAM quando comparado a concentração encontrada no plasma. Nenhuma diferença foi encontrada entre as concentrações de IL-6 no plasma das GC e GMF. Quando as amostras de LQAM foram divididas em grupo com e sem aneuploidia, não houve diferença estatística nas concentrações de IL-6, diferindo dos resultados do trabalho de Vesce. Isso pode ser justificado pelo fato que todas as amostras de LQAM deste estudo pertencerem a gestantes cujos fetos apresentaram alguma alteração na ultrassonografia. Além disso, essa diferença provavelmente se deve ao fato de que em nosso estudo a IG foi mais ampla (15-32 semanas) do que a estudada pelos referidos pesquisadores, que foi de 17 semanas gestacionais.

A malformação fetal pode estar relacionada ao maior estresse oxidativo e favorecer danos ao DNA, o que pode estar diretamente relacionado ao aumento de marcadores inflamatórios, conforme observado na quantificação das concentrações de citocinas MCP-1 e IL-1 β e danos ao DNA pelo ensaio do cometa/CBMN neste trabalho. Jensen e colegas (2006) encontraram em gestantes um polimorfismo na região promotora da proteína quimioatrativa

de monócitos-1 (MCP-1), que está associada a um risco aumentado da ocorrência de espinha bífida durante o desenvolvimento fetal. Além disso, MCP-1, juntamente com outras quimiocinas e citocinas, parece ser importante na sinalização entre o embrião e o endométrio durante a implantação e a placentação (KAYISLI; MAHUTTE; ARICI, 2002), que ocorre imediatamente antes da neurulação. Sugere-se que a MCP-1 seja um constituinte fisiológico do LQAM, pois um estudo detectou sua presença em todas as amostras que foram analisadas, o que sugere que suas concentrações sejam estáveis durante toda a gestação (ESPLIN et al., 2005). Neste trabalho, foi observada uma maior concentração de MCP-1 no LQAM em amostras do segundo trimestre gestacional. No soro não foi encontrada diferença entre os dois períodos. Existem relatos de concentrações elevadas de MCP-1 no colo do útero de mulheres e significativamente elevadas no LQAM de mulheres em trabalho de parto prematuro, com ou sem evidência de infecção (ESPLIN et al., 2005; KIM et al., 2022). Estudos encontraram redução significativa nas concentrações de MCP-1 do primeiro ao terceiro trimestre no soro de gestantes (POLARI et al., 2018; STOKKELAND et al., 2019). Neste estudo, o grupo GMF apresentou concentrações de MCP-1 maiores que as apresentadas pelo grupo GC.

A condição de RCIU pode induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , que pode aumentar a vasoconstrição do leito vascular placentário fetal (HEYBORNE; WITKIN; MCGREGOR, 1992; HOLCBERG et al., 2001). Embora algumas gestantes do grupo GMF apresentassem essa condição, neste trabalho não foi observada diferença nas concentrações sanguíneas de TNF- α entre GMF e GC. Contudo, as concentrações de TNF- α se mostraram mais altas no plasma do que no líquido amniótico em GMF.

Também foi sugerido que um perfil de citocinas originadas de células Th2 na gestação normal reduz a resposta materna aos antígenos fetais, com concentrações de interleucinas IL-4 e IL-10 particularmente aumentados (ENTRICAN, 2002; MITCHELL; TRAUTMAN; DUDLEY, 1993; PICCINNI, 2002; WEGMANN et al., 1993). IL-10 desempenha importante papel protetor contra disfunção vascular que está associada com hipertensão e inflamação durante a gestação (GUNNETT et al., 2000; GUNNETT; BERG; FARACI, 1999; LAI; KALKUNTE; SHARMA, 2011). A desregulação de IL-10 tem sido associada com complicações adversas da gestação, tais como parto prematuro, aborto espontâneo, restrição de crescimento fetal e pré-eclampsia (MURPHY et al., 2005; ROBERTSON; CARE; SKINNER, 2007; THAXTON; SHARMA, 2010). A IL-10 funciona

como um importante agente protetor contribuindo para a regulação da tolerância imunológica materna durante a gestação (CHENG; SHARMA, 2015). Neste estudo, não foi encontrada diferença estatística entre as concentrações de IL-10 em GMF e GC. Contudo, quando comparados os dois grupos de gestantes com o grupo de não gestantes, um aumento significativo de IL-10 foi observado nos dois grupos de gestantes, o que pode ser explicado pela redução da resposta materna aos antígenos fetais.

A associação entre o dano ao DNA e o processo inflamatório na malformação fetal é complexa e influenciada por vários fatores, como o grau do dano, a proficiência no reparo do DNA e a resposta imunológica de um indivíduo. Atualmente, há escassez de dados padronizados sobre este tema, o que justifica uma avaliação mais abrangente.

6 CONCLUSÃO

As concentrações séricas de FOL e VB12 não diferiram entre os grupos de gestantes analisados, indicando que a incidência de malformações fetais não foi causada pela deficiência destas vitaminas na amostra estudada.

As correlações positivas entre sangue e LQAM para VB12, FOL e HOMO sugerem que há um adequado transporte placentário nas gestantes com malformação fetal e consequente apropriado suprimento fetal com essas vitaminas.

Foi encontrada uma correlação negativa entre a dosagem de AFP no sangue e no LQAM, confirmando os dados da literatura que indicam um pico de AFP no LQAM em torno de 10 semanas de gestação, decaindo gradualmente até o parto e um aumento das concentrações séricas maternas até atingir um pico em torno de 32 semanas. A correlação negativa observada entre IG e AFP no LQAM corrobora esse dado.

Os resultados obtidos pela técnica do cometa e na frequência de MN indicam uma alta incidência de efeitos genotóxicos em mulheres gestantes com malformação fetal e nos seus fetos. Esses resultados permitem questionar se a presença de alguma malformação leva ao aumento do dano ao DNA, ou se a predisposição ao dano favoreceu a ocorrência de malformação.

A ausência de correlação entre os marcadores bioquímicos e os marcadores de danos ao DNA não permite atribuir a ocorrência de malformações a deficiência de FOL e VB12.

Citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , apresentaram concentrações variadas em amostras de sangue e LQAM. Notavelmente, as concentrações de IL-6 e IL-1 β exibiram uma correlação positiva com o IDN, indicando uma ligação potencial entre inflamação e proliferação celular. Estas descobertas esclarecem a intrincada interação entre danos ao DNA, respostas inflamatórias e malformações fetais, enfatizando a importância de considerar a idade materna e os perfis de citocinas nas avaliações pré-natais.

Embora este estudo forneça informações valiosas, são necessárias mais pesquisas para estabelecer dados normativos e desvendar os mecanismos multifacetados subjacentes a estas associações complexas.

REFERÊNCIAS

- ACAR, N.; USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: A review. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 2, p. 82–91, fev. 2011.
- ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 731–746, 1 dez. 2006.
- ADINOLFI, A.; ADINOLFI, M.; LESSOF. Alpha-feto-protein during development and in disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 12, n. 2, p. 138–151, 1 jun. 1975.
- ADZICK, N. S. Fetal myelomeningocele: Natural history, pathophysiology, and in-utero intervention. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, n. 1, p. 9–14, fev. 2010.
- AHMADZIA, H. K. et al. Predicting peripartum blood transfusion in women undergoing cesarean delivery: A risk prediction model. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208417, 14 dez. 2018.
- ALBERMAN, E.; MUTTON, D.; MORRIS, J. K. Cytological and epidemiological findings in trisomies 13, 18, and 21: England and Wales 2004-2009. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158A, n. 5, p. 1145–1150, maio 2012.
- ALLEN, E. G. et al. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. **Human Genetics**, v. 125, n. 1, p. 41–52, 3 fev. 2009.
- ALLEN, L. H. Vitamin B12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 352, p. 173–86, 1994.
- ALVAREZ-NAVA, F. et al. Elevated second-trimester maternal serum β -human chorionic gonadotropin and amniotic fluid alpha-fetoprotein as indicators of adverse obstetric outcomes in fetal Turner syndrome. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 12, p. 1891–1898, dez. 2015.
- ANDERSSON, A. et al. Decreased serum homocysteine in pregnancy. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies**, v. 30, n. 6, p. 377–9, jun. 1992.
- ANGUEIRA, A. R. et al. New Insights Into Gestational Glucose Metabolism: Lessons Learned From 21st Century Approaches. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 327–334, 1 fev. 2015.
- ANTONARAKIS, S. E. Parental Origin of the Extra Chromosome in Trisomy 21 as Indicated by Analysis of DNA Polymorphisms. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 13, p. 872–876, 28 mar. 1991.

ANTONARAKIS, S. E. et al. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. **Nature Genetics**, v. 3, n. 2, p. 146–150, fev. 1993.

ANTONARAKIS, S. E. 10 Years of Genomics, Chromosome 21, and Down Syndrome. **Genomics**, v. 51, n. 1, p. 1–16, jul. 1998.

ARCURI, F. et al. Differential Regulation of Colony Stimulating Factor 1 and Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression by Inflammatory Cytokines in Term Human Decidua: Implications for Macrophage Trafficking at the Fetal-Maternal Interface¹. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 433–439, 1 mar. 2007.

AVAGLIANO, L. et al. Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 19, p. 1455–1467, 15 nov. 2019.

AZAR, G. B. et al. Fetal Nuchal Cystic Hygromata: Associated Malformations and Chromosomal Defects. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 6, n. 1–2, p. 46–57, 1991.

AZQUETA, A. et al. **Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. Mutation Research - Reviews in Mutation Research** Elsevier B.V., 1 jan. 2020.

BABAZADEH, Z. et al. Sperm DNA damage and its relation with leukocyte DNA damage. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 120–124, jan. 2010.

BANERJEE, S. et al. A link between high serum levels of human chorionic gonadotrophin and chorionic expression of its mature functional receptor (LHCGR) in Down's syndrome pregnancies. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 25, 21 dez. 2005.

BANNISTER, C. M. Li JK: Neural Tube Defects – From Origin to Treatment Edited by: Diego F Wyszynski. Oxford University Press, New York; 2006. **Cerebrospinal Fluid Research**, v. 3, n. 1, p. 6, 3 dez. 2006.

BARFORD, D. A.; DICKERMAN, L. H.; JOHNSON, W. E. α -Fetoprotein: Relationship between maternal serum and amniotic fluid levels. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 151, n. 8, p. 1038–1041, abr. 1985.

BARLOW, G. M. et al. Down syndrome congenital heart disease: A narrowed region and a candidate gene. **Genetics in Medicine**, v. 3, n. 2, p. 91–101, mar. 2001.

BARRESI, M. J. F.; GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 12. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2020.

BARRETT, S. L.; BOWER, C.; HADLOW, N. C. Use of the combined first-trimester screen result and low PAPP-A to predict risk of adverse fetal outcomes. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 1, p. 28–35, jan. 2008.

- BARTELS, P. C.; HELLEMAN, P. W.; SOONS, J. B. J. Investigation of red cell size-distribution histograms related to folate, vitamin B12 and iron state in the course of pregnancy. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 49, n. 8, p. 763–771, 8 jan. 1989.
- BAUER, S. et al. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Trophoblast Migration through Elevation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in First-Trimester Villous Explant Cultures. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 2, p. 812–822, fev. 2004.
- BAXI, L. et al. Recurrent Cystic Hygroma with Hydrops. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 25, n. 1, p. 127–129, 2009.
- BEAUDIN, A. E.; STOVER, P. J. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: A minireview. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 4, p. 274–284, abr. 2009.
- BECKER, R.; WEGNER, R. -D. Detailed screening for fetal anomalies and cardiac defects at the 11–13-week scan. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 27, n. 6, p. 613–618, 28 jun. 2006.
- BEILIN, Y. Anesthesia for nonobstetric surgery during pregnancy. **The Mount Sinai journal of medicine, New York**, v. 65, n. 4, p. 265–70, set. 1998.
- BENDON, R. W. The anatomic basis of maternal serum screening. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 21, n. 1, p. 36–9, 1991.
- BENN, P. et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. **Prenatal Diagnosis**, v. 35, n. 8, p. 725–734, ago. 2015.
- BERGGREN, E. K. et al. Are the metabolic changes of pregnancy reversible in the first year postpartum? **Diabetologia**, v. 58, n. 7, p. 1561–1568, 10 jul. 2015.
- BERGSTRAND, C. G.; CZAR, B. Demonstration of a New Protein Fraction in Serum from the Human Fetus. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 8, n. 2, p. 174–174, 8 jan. 1956.
- BERKELEY, A. S.; KILLACKEY, M. A.; CEDERQVIST, L. L. Elevated maternal serum α -fetoprotein levels associated with breakdown in fetal-maternal-placental barrier. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 146, n. 7, p. 859–861, ago. 1983.
- BERMÚDEZ, L. et al. Assessment of ten trace elements in umbilical cord blood and maternal blood: association with birth weight. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 291, 7 dez. 2015.

- BERNSTEIN, I. Plasma volume expansion in early pregnancy*1. **Obstetrics & Gynecology**, v. 97, n. 5, p. 669–672, maio 2001.
- BERRY, R. J. et al. Prevention of Neural-Tube Defects with Folic Acid in China. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 20, p. 1485–1490, 11 nov. 1999.
- BERTI, C. et al. **Micronutrients in pregnancy: Current knowledge and unresolved questions**. **Clinical Nutrition**, dez. 2011.
- BHATIA, P.; CHHABRA, S. Physiological and anatomical changes of pregnancy: Implications for anaesthesia. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 62, n. 9, p. 651, 2018.
- BLANCO, R. et al. Maternal biomarkers of methylation status and non-syndromic orofacial cleft risk: a meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 11, p. 1323–1332, nov. 2016.
- BLENCOWE, H. et al. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. Supplement 1, p. i110–i121, 1 abr. 2010.
- BLOHM, M. E. G. et al. Alpha -Fetoprotein (AFP) Reference Values in Infants up to 2 Years of Age. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 15, n. 2, p. 135–142, 5 jan. 1998.
- BLOM, H. J. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 4, p. 295–302, 19 abr. 2009.
- BLOUNT, B. C. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3290–3295, abr. 1997.
- BLOUNT, B. C.; AMES, B. N. 2 DNA damage in folate deficiency. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 8, n. 3, p. 461–478, set. 1995.
- BOLDT, H. B.; CONOVER, C. A. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 17, n. 1, p. 10–18, fev. 2007.
- BOLUFER, P. et al. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. **Leukemia Research**, v. 30, n. 12, p. 1471–1491, dez. 2006.
- BOTTO, L. D. et al. Neural-Tube Defects. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 20, p. 1509–1519, 11 nov. 1999.
- BOULET, S. L. et al. Trends in the postfortification prevalence of spina bifida and anencephaly in the United States. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 82, n. 7, p. 527–532, jul. 2008.

BRACE, R. A.; WOLF, E. J. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 161, n. 2, p. 382–388, ago. 1989.

BRADLEY JR., J. S.; PARR, E. J.; SHARKEY, K. A. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **Cell and Tissue Research**, v. 289, n. 3, p. 455–461, 1 ago. 1997.

BRAMELD, K. J. et al. First trimester predictors of adverse pregnancy outcomes. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 48, n. 6, p. 529–535, 22 dez. 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Assistência pré-natal. Manual Técnico**, 2000.

BRASIL. **RDC 304, DE 7 DE NOVEMBRO DE 2002. Ministério da Saúde**, 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica**, 2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Diagnóstico de anomalias congênitas no pré-natal e ao nascimento**, 2022.

BRELJE, T. C. et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 879–887, fev. 1993.

BROSENS, I. et al. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 193–201, mar. 2011.

BROUNS, R. et al. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 6, p. 485–493, jun. 2008.

BROUSSARD, C. N.; RICHTER, J. E. NAUSEA AND VOMITING OF PREGNANCY. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 123–151, mar. 1998.

BRUMFIELD, C. G. et al. The relationship between maternal serum and amniotic fluid α -fetoprotein in women undergoing early amniocentesis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, n. 3, p. 903–906, set. 1990.

BUI, T.-H. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon! **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 3, p. 247–251, set. 2007.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. Review: The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. **Placenta**, v. 33, p. S23–S27, fev. 2012.

- BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1663, p. 20140066, 5 mar. 2015.
- BUTLER, A. E. et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. **Diabetologia**, v. 53, n. 10, p. 2167–2176, 5 out. 2010.
- BUTOLA, L. K. et al. Vitamin B12 - Do You Know Everything? **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 9, n. 42, p. 3139–3146, 19 out. 2020.
- BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus,,,,. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1256S-1261S, maio 2000.
- CABRERA, R. M. et al. Autoantibodies to folate receptor during pregnancy and neural tube defect risk. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p. 85–92, out. 2008.
- CAMERON, M.; MORAN, P. Prenatal screening and diagnosis of neural tube defects. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 4, p. 402–411, abr. 2009.
- CAMERON- PIMBLETT, A. et al. The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan. **Clinical Endocrinology**, v. 87, n. 5, p. 532–538, nov. 2017.
- CAMPBELL, J. et al. Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 99, n. 7, p. 563–565, jul. 1992.
- CANANZI, M.; DE COPPI, P. CD117 + amniotic fluid stem cells. **Organogenesis**, v. 8, n. 3, p. 77–88, 27 jul. 2012.
- CANFIELD, M. A. et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: Findings from a multi-state population-based study. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 73, n. 10, p. 679–689, out. 2005.
- CAREY, J. C. TRISOMY 18 AND TRISOMY 13 SYNDROMES. Em: **Cassidy and Allanson's Management of Genetic Syndromes**. [s.l.] Wiley, 2021. p. 937–956.
- CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 204, n. 3, p. 379–406, mar. 1988.
- CARTER, A. M. Placental Oxygen Consumption. Part I: In Vivo Studies—A Review. **Placenta**, v. 21, p. S31–S37, mar. 2000.

CARVALHO, M. H. B. et al. Detection of fetal structural abnormalities at the 11-14 week ultrasound scan. **Prenatal Diagnosis**, v. 22, n. 1, p. 1–4, jan. 2002.

CASANUEVA, E.; VITERI, F. E. **Metabolism Iron and Oxidative Stress in Pregnancy 1,2J. Nutr.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/133/5/1700S/4558571>>.

CHALLIS, J. R. et al. **Inflammation and pregnancy.** Reproductive Sciences. **Anais...fev.** 2009.

CHANG, Y.-W. et al. An overview of a 30-year experience with amniocentesis in a single tertiary medical center in Taiwan. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 51, n. 2, p. 206–211, jun. 2012.

CHASEN, S. T. Maternal Serum Analyte Screening for Fetal Aneuploidy. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 57, n. 1, p. 182–188, mar. 2014.

CHATTERJEE, P. et al. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 27 maio 2014.

CHEN, Y. et al. Diagnostic value of maternal alpha-fetoprotein variants in second-trimester biochemical screening for trisomy 21 and 18. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 13605, 10 ago. 2022a.

CHEN, Y. et al. Ultrasound findings in prenatal diagnosis of trisomy 18 associated with elevated levels of maternal serum alpha-fetoprotein. **Medicine: Case Reports and Study Protocols**, v. 3, n. 10, p. e0238, 5 out. 2022b.

CHENG, S.-B.; SHARMA, S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 6, p. 487–500, jun. 2015.

CHEONG, K. F. et al. Variants of chromosome 9 in phenotypically normal individuals. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 26, n. 3, p. 312–4, maio 1997.

CHERVENAK, F. A. et al. Fetal Cystic Hygroma. **New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 14, p. 822–825, 6 out. 1983.

CHEUNG, K. L.; LAFAYETTE, R. A. Renal Physiology of Pregnancy. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 20, n. 3, p. 209–214, maio 2013.

CHOW, S. S. W. et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 78–84, out. 2008.

CHRISTIAN, L. M.; PORTER, K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 134–140, dez. 2014.

- CHRISTIANSEN, O. B.; NIELSEN, H. S.; KOLTE, A. M. Inflammation and miscarriage. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 11, n. 5, p. 302–308, out. 2006.
- CHUNDURI, N. K.; STORCHOVÁ, Z. The diverse consequences of aneuploidy. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 54–62, 2 jan. 2019.
- CIKOT, R. J. L. M. et al. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 49–58, 9 jan. 2001.
- CIMINI, D.; DEGRASSI, F. **Aneuploidy: A matter of bad connections**. **Trends in Cell Biology**, ago. 2005.
- CLARK, S. L. et al. Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 161, n. 6, p. 1439–1442, dez. 1989.
- COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 759, p. 27–39, jan. 2014.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 17 fev. 2008.
- CONKLIN, K. A. Maternal physiological adaptations during gestation, labor, and the puerperium. **Seminars in anesthesia**, v. 10, p. 221–234, 1991.
- CONNOLLY, K. A. Amniocentesis: A contemporary review. **World Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 5, n. 1, p. 58, 2016.
- CONOVER, C. A. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 242–249, maio 2012.
- COPP, A. J. et al. Spina bifida. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15007, 30 abr. 2015.
- COPP, A. J.; BROOK, F. A. Does lumbosacral spina bifida arise by failure of neural folding or by defective canalisation? **Journal of Medical Genetics**, v. 26, n. 3, p. 160–166, 1 mar. 1989.
- COPP, A. J.; GREENE, N. DE. Genetics and development of neural tube defects. **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 217–230, jan. 2010.
- COPP, A. J.; GREENE, N. D. E.; MURDOCH, J. N. The genetic basis of mammalian neurulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 784–793, 1 out. 2003.
- COPPEDÈ, F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 54–70, jul. 2009.

CORREGGIO, K. S. DA. **Quantificação de dano de DNA no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos da Maternidade do Hospital Universitário – UFSC e correlação com o sangue materno.** Florianópolis: UFSC, 2018.

COSTA, M. A. The endocrine function of human placenta: an overview. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 1, p. 14–43, jan. 2016.

COSTANTINE, M. M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 3 abr. 2014.

COTTER, A. M. et al. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: A risk factor for the development of severe preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, n. 4, p. 781–785, out. 2001.

COUSSONS-READ, M. E.; OKUN, M. L.; NETTLES, C. D. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 343–350, mar. 2007.

CRANDALL, B. F. et al. Maternal serum alpha-fetoprotein screening for the detection of neural tube defects. **The Western journal of medicine**, v. 138, n. 4, p. 524–30, abr. 1983.

CRANDALL, B. F.; CHUA, C. Risks for Fetal Abnormalities after very and moderately elevated AF-AFPs. **Prenatal Diagnosis**, v. 17, n. 9, p. 837–841, set. 1997.

CRANDALL, B. F.; MATSUMOTO, M.; PERDUE, S. **Amniotic fluid-AFP in down syndrome and other chromosome abnormalities.** **Prenatal Diagnosis**, v. 8, p. 255-262, 1988.

CUCKLE, H. S.; HOLDING, S.; JONES, R. Maternal serum inhibin levels in second-trimester down's syndrome pregnancies. **Prenatal Diagnosis**, v. 14, n. 5, p. 387–390, maio 1994.

CUCKLE, H. S.; WALD, N. J.; LINDENBAUM, R. H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for down syndrome. **The Lancet**, 1984.

CULLEN, M. T. et al. Diagnosis and significance of cystic hygroma in the first trimester. **Prenatal Diagnosis**, v. 10, n. 10, p. 643–651, out. 1990.

CURRY, A. E. et al. Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. 152–160, abr. 2008.

CZEIZEL, A. E. et al. Possible association of folic acid supplementation during pregnancy with reduction of preterm birth: a population-based study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 148, n. 2, p. 135–140, fev. 2010.

CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I. Prevention of the First Occurrence of Neural-Tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 26, p. 1832–1835, 24 dez. 1992.

DA CORREGGIO, K. S. et al. DNA damage analysis in newborns and their mothers related to pregnancy and delivery characteristics. **Placenta**, v. 115, p. 139–145, nov. 2021.

DADVAND, P. et al. Maternal exposure to particulate air pollution and term birth weight: A multi-country evaluation of effect and heterogeneity. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 3, p. 367–373, 2013.

DANA, M.; STOIAN, V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. **Maedica**, v. 7, n. 1, p. 25–9, jan. 2012.

D'ANTONIO, F. et al. Association between first-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and obstetric complications. **Prenatal Diagnosis**, v. 33, n. 9, p. 839–847, 10 set. 2013.

DAWSON, E.; EVANS, D.; VAN HOOK, J. Amniotic Fluid B 12 And Folate Levels Associated with Neural Tube Defects. **American Journal of Perinatology**, v. 15, n. 09, p. 511–514, 4 mar. 1998.

DE HAAS, S. et al. Physiological adaptation of maternal plasma volume during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 49, n. 2, p. 177–187, fev. 2017.

DE OLIVEIRA MANN, C. C.; KRANZUSCH, P. J. cGAS Conducts Micronuclei DNA Surveillance. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 10, p. 697–698, out. 2017.

DE WALSH, P. et al. Reduction in Neural-Tube Defects after Folic Acid Fortification in Canada. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 2, p. 135–142, 12 jul. 2007.

DEKEL, N. et al. The Role of Inflammation for a Successful Implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 2, p. 141–147, ago. 2014.

DEKKER, G. A. et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, n. 4, p. 1042–1048, out. 1995.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 81, n. 3, p. 155–162, set. 2007.

DENNY, K. J. et al. Neural tube defects, folate, and immune modulation. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 97, n. 9, p. 602–609, set. 2013.

DE-REGIL, L. M. et al. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. Em: DE-REGIL, L. M. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

DEY, M.; SHARMA, S.; AGGARWAL, S. **Prenatal screening methods for aneuploidies.** *North American Journal of Medical Sciences*, mar. 2013.

DORAN, T. A. et al. Maternal serum α -fetoprotein and fetal autosomal trisomies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 154, n. 2, p. 277–281, fev. 1986.

DRAKE, P. M. et al. Human Placental Cytotrophoblasts Attract Monocytes and Cd56bright Natural Killer Cells via the Actions of Monocyte Inflammatory Protein 1 α . *The Journal of Experimental Medicine*, v. 193, n. 10, p. 1199–1212, 21 maio 2001.

EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 13, n. 1, p. 34–43, 1989.

EBARA, S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*, v. 57, n. 5, p. 138–141, 25 set. 2017.

ECONOMIDES, D. L. et al. Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 99, n. 1, p. 23–25, jan. 1992.

ECONOMIDES, D. L.; BRAITHWAITE, J. M. First trimester ultrasonographic diagnosis of fetal structural abnormalities in a low risk population. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 105, n. 1, p. 53–57, jan. 1998.

EDELSTAM, G. et al. New reference values for routine blood samples and human neutrophilic lipocalin during third-trimester pregnancy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 61, n. 8, p. 583–591, 8 jan. 2001.

EDEY, L. F. et al. The Local and Systemic Immune Response to Intrauterine LPS in the Prepartum Mouse. *Biology of Reproduction*, v. 95, n. 6, p. 125–125, 16 dez. 2016.

ELIZABETH, K. E. et al. Folate, vitamin B12, homocysteine and polymorphisms in folate metabolizing genes in children with congenital heart disease and their mothers. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, n. 12, p. 1437–1441, 1 dez. 2017.

EL-MANSOURY, M. et al. Chromosomal mosaicism mitigates stigmata and cardiovascular risk factors in Turner syndrome. *Clinical Endocrinology*, v. 66, n. 5, p. 744–751, maio 2007.

ENTRICAN, G. Immune Regulation during Pregnancy and Host–Pathogen Interactions in Infectious Abortion. *Journal of Comparative Pathology*, v. 126, n. 2–3, p. 79–94, fev. 2002.

ERLEBACHER, A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 1, p. 23–33, 14 jan. 2013.

ESPLIN, M. S. et al. Monocyte chemotactic protein-1 is increased in the amniotic fluid of women who deliver preterm in the presence or absence of intra-amniotic infection. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 365–373, 1 jun. 2005a.

ESPLIN, M. S. et al. Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor. **Placenta**, v. 26, n. 8–9, p. 661–671, set. 2005b.

FALCK, A. J. et al. Developmental Exposure to Environmental Toxicants. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 5, p. 1173–1197, out. 2015.

FALL, C. H. D. et al. Multiple Micronutrient Supplementation during Pregnancy in Low-Income Countries: A Meta-Analysis of Effects on Birth Size and Length of Gestation. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 30, n. 4_suppl4, p. S533–S546, 25 dez. 2009.

FBASD. **Federação Brasileira das Associações de Síndrome de Down**.

FEDOSOV, S. N. Physiological and Molecular Aspects of Cobalamin Transport. Em: [s.l: s.n.]. p. 347–367.

FELDKAMP, M. L. et al. Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. **BMJ**, p. j2249, 30 maio 2017.

FELDT–RASMUSSEN, U.; MATHIESEN, E. R. Endocrine disorders in pregnancy: Physiological and hormonal aspects of pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 875–884, dez. 2011.

FELKNER, M. et al. Maternal serum homocysteine and risk for neural tube defects in a Texas-Mexico border population. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 6, p. 574–581, jun. 2009.

FENECH, M. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 7, p. 1163–1171, 1 jul. 1998.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, nov. 2000.

FENECH, M. **The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells** *Mutation Research*. [s.l: s.n.].

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 475, n. 1–2, p. 57–67, abr. 2001b.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation**

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 600, n. 1–2, p. 58–66, ago. 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, maio 2007.

FENECH, M. 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, 1 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, 1 jan. 2011.

FENECH, M. **Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity**. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 1 maio 2012.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 12–25, out. 2016a.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 12–25, out. 2016b.

FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1203, 15 out. 2020.

FENECH, M.; AITKEN, C.; RINALDI, J. **Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults**. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 7, p. 1163–1171, 1998.

FERNANDES-COSTA, F.; METZ, J. Levels of transcobalamins I, II, and III during pregnancy and in cord blood. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 87–94, 1 jan. 1982.

FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 1, n. 5, p. 228–237, maio 1990.

FINKELSTEIN, J. D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, n. S2, p. S40–S44, 24 mar. 1998.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Homocysteine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 4, p. 385–389, abr. 2000.

FINKELSTEIN, J. L.; LAYDEN, A. J.; STOVER, P. J. **Vitamin B-12 and Perinatal Health. Advances in Nutrition**American Society for Nutrition, , 2015.

FORGES, T. et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 225–238, 1 maio 2007.

FORTUNATO, S. J.; MENON, R.; LOMBARDI, S. J. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, n. 5, p. 1159–1162, nov. 2002.

FREY, L.; HAUSER, W. A. Epidemiology of Neural Tube Defects. **Epilepsia**, v. 44, n. s3, p. 4–13, 9 jun. 2003.

FURNESS, D. et al. Folate, Vitamin B12, Vitamin B6 and homocysteine: Impact on pregnancy outcome. **Maternal and Child Nutrition**, v. 9, n. 2, p. 155–166, abr. 2013.

FURNESS, D. L. F. et al. Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated prospectively with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 489–498, set. 2010.

FURNESS, D. L. F.; DEKKER, G. A.; ROBERTS, C. T. **DNA damage and health in pregnancy. Journal of Reproductive Immunology**, maio 2011.

GAISER, R. **Physiologic changes of pregnancy**. 5. ed. Philadelphia: Chestnut's Obstetric Anesthesia: Principles and Practice Elsevier Saunders, 2014.

GANAPATHY, V.; SMITH, S. B.; PRASAD, P. D. SLC19: the folate/thiamine transporter family. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 641–646, 1 fev. 2004.

GARDIKI-KOUIDOU, P.; SELLER, M. J. Amniotic fluid folate, vitamin B12 and transcobalamins in neural tube defects. **Clinical Genetics**, v. 33, n. 6, p. 441–448, 28 jun. 2008.

GATTI, L. et al. Hemostatic parameters and platelet activation by flow-cytometry in normal pregnancy: a longitudinal study. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 24, n. 4, p. 217–219, dez. 1994.

GAULL, G.; STURMAN, J. A.; RÄIHÄ, N. C. R. Development of Mammalian Sulfur Metabolism: Absence of Cystathionase in Human Fetal Tissues. **Pediatric Research**, v. 6, n. 6, p. 538–547, jun. 1972.

GELALETI, R. B. et al. Increased DNA Damage is Related to Maternal Blood Glucose Levels in the Offspring of Women With Diabetes and Mild Gestational Hyperglycemia. **Reproductive Sciences**, v. 23, n. 3, p. 318–323, 1 mar. 2016.

GHI, T. et al. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 48, n. 2, p. 256–268, ago. 2016.

GHIDINI, A. et al. Elevated Amniotic Fluid Interleukin-6 Levels During the Early Second Trimester Are Associated With Greater Risk of Subsequent Preterm Delivery. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 3, p. 227–231, mar. 1997.

GILROY, R. J.; MANGURA, B. T.; LAVIETES, M. H. Rib Cage and Abdominal Volume Displacements during Breathing in Pregnancy. **American Review of Respiratory Disease**, v. 137, n. 3, p. 668–672, mar. 1988.

GLOWSKA-CIEMNY, J. et al. Alpha-fetoprotein (AFP) — new aspects of a well-known marker in perinatology. **Ginekologia Polska**, v. 93, n. 1, p. 70–75, 31 jan. 2022.

GNAINSKY, Y. et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action. **REPRODUCTION**, v. 149, n. 1, p. 75–85, jan. 2015.

GOEL, N. et al. Trisomy 13 and 18—Prevalence and mortality—A multi-registry population based analysis. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 12, p. 2382–2392, 30 dez. 2019.

GOONEWARDENE, M.; SHEHATA, M.; HAMAD, A. Anaemia in pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26, n. 1, p. 3–24, fev. 2012a.

GOONEWARDENE, M.; SHEHATA, M.; HAMAD, A. Anaemia in pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26, n. 1, p. 3–24, fev. 2012b.

GOSDEN, C.; BROCK, D. J. Combined use of alphafetoprotein and amniotic fluid cell morphology in early prenatal diagnosis of fetal abnormalities. **Journal of Medical Genetics**, v. 15, n. 4, p. 262–270, 1 ago. 1978.

GRABER, S. E. et al. Placental transport of vitamin B12 in the pregnant rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 5, p. 1000–1004, 1 maio 1971.

GRAVHOLT, C. H. et al. Turner syndrome: mechanisms and management. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 10, p. 601–614, 18 out. 2019.

GREEN, R. et al. Vitamin B12 deficiency. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17040, 29 jun. 2017.

GREENBERG, J. A. et al. Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 4, n. 2, p. 52–9, 2011.

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 4, p. 303–311, abr. 2009.

- GRUHN, J. R. et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. **Science**, v. 365, n. 6460, p. 1466–1469, 27 set. 2019.
- GRUJIČIĆ, D. et al. The effect of combined therapy with ritodrine, erythromycin and verapamil on the frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of pregnant women. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 1, p. 11–15, mar. 2007.
- GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 109, n. 7, p. 784–791, jul. 2002.
- GUILBERT, L.; ROBERTSON, S. A.; WEGMANN, T. G. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. **Immunology and Cell Biology**, v. 71, n. 1, p. 49–57, fev. 1993.
- GUNNETT, C. A. et al. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 4, p. H1555–H1562, 1 out. 2000.
- GUNNETT, C. A.; BERG, D. J.; FARACI, F. M. Vascular Effects of Lipopolysaccharide Are Enhanced in Interleukin-10–Deficient Mice. **Stroke**, v. 30, n. 10, p. 2191–2196, out. 1999.
- GUO, Q. et al. Parental Genetic Variants, MTHFR 677C>T and MTRR 66A>G, Associated Differently with Fetal Congenital Heart Defect. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017.
- GURBUZ, A. et al. Can Serum HCG Values Be Used in the Differential Diagnosis of Pregnancy Complicated by Hypertension? **Hypertension in Pregnancy**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 7 jan. 2004.
- GUS, R. **Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética**. Citogenética Humana ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- HAAK, M. C. Pathophysiology of increased nuchal translucency: a review of the literature. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 175–184, 1 mar. 2003.
- HAGUE, W. M. Homocysteine and pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 459–469, 2003.
- HAIDER, B. A. et al. Anaemia, prenatal iron use, and risk of adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 346, n. jun21 3, p. f3443–f3443, 21 jun. 2013.
- HALSCOTT, T. L.; RAMSEY, P. S.; REDDY, U. M. First trimester screening cannot predict adverse outcomes yet. **Prenatal Diagnosis**, v. 34, n. 7, p. 668–676, 8 jul. 2014.

- HANNA, N. et al. Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5721–5728, 1 jun. 2000.
- HARDING, S. M. et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 466–470, 31 ago. 2017.
- HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 4, p. 280–291, 1 abr. 2001.
- HASSOLD, T. J. et al. Maternal Folate Polymorphisms and the Etiology of Human Nondisjunction. **The American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 2, p. 434–439, ago. 2001.
- HATTORI, Y. et al. Catalytic ferrous iron in amniotic fluid as a predictive marker of human maternal-fetal disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 57–63, 2015.
- HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 1 dez. 2016.
- HEGEWALD, M. J.; CRAPO, R. O. Respiratory Physiology in Pregnancy. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 1, p. 1–13, mar. 2011.
- HEIKKINEN, J. et al. Cytokine Levels in Midtrimester Amniotic Fluid in Normal Pregnancy and in the Prediction of Pre-eclampsia. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, n. 3, p. 310–314, mar. 2001.
- HEINRICH, T. et al. Live-Born Trisomy 22: Patient Report and Review. **Molecular Syndromology**, v. 3, n. 6, p. 262–269, 2012.
- HERBERT, V.; ZALUSKY, R. INTERRELATIONS OF VITAMIN B12 AND FOLIC ACID METABOLISM: FOLIC ACID CLEARANCE STUDIES*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 6, p. 1263–1276, 1 jun. 1962.
- HEYBORNE, K. D.; WITKIN, S. S.; MCGREGOR, J. A. Tumor necrosis factor- α in midtrimester amniotic fluid is associated with impaired intrauterine fetal growth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, n. 4, p. 920–925, out. 1992.
- HIGBY, K. et al. Normal values of urinary albumin and total protein excretion during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, n. 4, p. 984–989, out. 1994.
- HILALI, N. et al. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 170, n. 2, p. 377–380, out. 2013.

HILL, C. C.; PICKINPAUGH, J. Physiologic Changes in Pregnancy. **Surgical Clinics of North America**, v. 88, n. 2, p. 391–401, abr. 2008.

HIXSON, L. et al. **An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. Journal of Laboratory Automation** SAGE Publications Inc., , 22 out. 2015.

HODGKIN, D. C. et al. Structure of Vitamin B12. **Nature**, v. 178, n. 4524, p. 64–66, jul. 1956.

HOET, J. J.; HANSON, M. A. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **The Journal of Physiology**, v. 514, n. 3, p. 617–627, 8 fev. 1999.

HOLCBERG, G. et al. Increased production of tumor necrosis factor- α TNF- α by IUGR human placentae. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 94, n. 1, p. 69–72, jan. 2001.

HONEIN, M. A. Impact of Folic Acid Fortification of the US Food Supply on the Occurrence of Neural Tube Defects. **JAMA**, v. 285, n. 23, p. 2981, 20 jun. 2001.

HU, T. et al. Chromosomal Aberrations in Pediatric Patients with Developmental Delay/Intellectual Disability: A Single-Center Clinical Investigation. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–16, 6 nov. 2019.

HUANG, N.; CHI, H.; QIAO, J. Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 26 jun. 2020.

HUETHER, C. A. et al. Sex ratios in fetuses and liveborn infants with autosomal aneuploidy. **American Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 3, p. 492–500, 14 jun. 1996.

HUISMAN, A. et al. Whole blood viscosity during normal pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 94, n. 12, p. 1143–1149, dez. 1987.

HUNT, J. N.; MURRAY, F. A. GASTRIC FUNCTION IN PREGNANCY. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 65, n. 1, p. 78–83, fev. 1958.

HYETT, J. et al. Abnormalities of the heart and great arteries in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 11–13 weeks of gestation. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 7, n. 4, p. 245–250, 22 abr. 1996.

HYETT, J. et al. Using fetal nuchal translucency to screen for major congenital cardiac defects at 10-14 weeks of gestation: population based cohort study. **BMJ**, v. 318, n. 7176, p. 81–85, 9 jan. 1999.

- IACOBAZZI, V. et al. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 1–2, p. 27–33, set. 2014.
- IGNACIO RODRIGUEZ, J. et al. Trisomy 13 Syndrome and Neural Tube Defects. **American Journal of Medical Genetics**, v. 36, p. 513-516, 1990.
- ILAGAN, J. G. et al. Abnormal multiple marker screens are associated with adverse perinatal outcomes in cases of intrauterine growth restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 4, p. 1465–1469, out. 2004.
- IONESCU, M. E. et al. Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. **Maedica**, v. 6, n. 3, p. 173–8, jul. 2011.
- J SIDDIQUA, T. Vitamin B12 Deficiency in Pregnancy and Lactation: Is there a Need for Pre and Post-natal Supplementation? **Journal of Nutritional Disorders & Therapy**, v. 04, n. 02, 2014.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, 22 out. 2009.
- JAMES, S. J. et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 495–501, out. 1999.
- JENSEN, D. et al. Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 161, n. 1, p. 76–86, mar. 2008.
- JENSEN, L. E. et al. Maternal genotype for the monocyte chemoattractant protein 1 A(-2518)G promoter polymorphism is associated with the risk of spina bifida in offspring. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 140A, n. 10, p. 1114–1118, 15 maio 2006.
- JOKHI, P. P. et al. Secretion of colony stimulating factor-1 by human first trimester placental and decidual cell populations and the effect of this cytokine on trophoblast thymidine uptake in vitro. **Human Reproduction**, v. 10, n. 10, p. 2800–2807, out. 1995.
- KAGAN, K. O. et al. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by maternal age, fetal nuchal translucency, fetal heart rate, free -hCG and pregnancy-associated plasma protein-A. **Human Reproduction**, v. 23, n. 9, p. 1968–1975, 20 jun. 2008.
- KARK, J. D. et al. Nonfasting Plasma Total Homocysteine Level and Mortality in Middle-Aged and Elderly Men and Women in Jerusalem. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, n. 5, p. 321, 7 set. 1999.

KATZ, M.; SOKAL, M. M. Skin perfusion in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 137, n. 1, p. 30–33, maio 1980.

KAY, J. et al. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. **DNA Repair**, v. 83, p. 102673, nov. 2019.

KAYISLI, U. A.; MAHUTTE, N. G.; ARICI, A. Uterine Chemokines in Reproductive Physiology and Pathology. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 4, p. 213–221, abr. 2002.

KEEFE, D. L.; LIU, L. Telomeres and reproductive aging. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 1, p. 10, 2009.

KHARFI, A. et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 717–721, ago. 2005.

KIBIRIGE, D.; MWEBAZE, R. Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified? **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, p. 12-17, 2013.

KIM, K.; FRISO, S.; CHOI, S.-W. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 917–926, dez. 2009.

KIM, S. A. et al. Inflammatory Proteins in the Amniotic Fluid, Plasma, and Cervicovaginal Fluid for the Prediction of Intra-Amniotic Infection/Inflammation and Imminent Preterm Birth in Preterm Labor. **American Journal of Perinatology**, v. 39, n. 07, p. 766–775, 14 maio 2022.

KIM, S.-M.; KIM, J.-S. A Review of Mechanisms of Implantation. **Development & Reproduction**, v. 21, n. 4, p. 351–359, dez. 2017.

KIMWALLER, D. et al. The association between maternal serum alpha-fetoprotein and preterm birth, small for gestational age infants, preeclampsia, and placental complications. **Obstetrics & Gynecology**, v. 88, n. 5, p. 816–822, nov. 1996.

KIRALY, O. et al. Inflammation-Induced Cell Proliferation Potentiates DNA Damage-Induced Mutations In Vivo. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 2, p. e1004901, 3 fev. 2015.

KIRKE, P. N. et al. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. **The Quarterly journal of medicine**, v. 86, n. 11, p. 703–8, nov. 1993.

KLINE, J. A.; WILLIAMS, G. W.; HERNANDEZ-NINO, J. D-Dimer Concentrations in Normal Pregnancy: New Diagnostic Thresholds Are Needed. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 825–829, 1 maio 2005.

- KOCH, C. A.; PLATT, J. L. T cell recognition and immunity in the fetus and mother. **Cellular Immunology**, v. 248, n. 1, p. 12–17, jul. 2007.
- KOEBNICK, C. et al. Longitudinal Concentrations of Vitamin B12 and Vitamin B12-binding Proteins during Uncomplicated Pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 928–933, 1 jun. 2002.
- KOGA, K.; MOR, G. Toll-Like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 587–600, 29 mar. 2010.
- KONIJNENBERG, A. et al. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: Enhanced expression of cell adhesion molecules. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, n. 2, p. 461–469, fev. 1997.
- KORNACKI, J. et al. Polyhydramnios — frequency of congenital anomalies in relation to the value of the amniotic fluid index. **Ginekologia Polska**, v. 88, n. 8, p. 442–445, 31 ago. 2017.
- KOWALCZYK, T. Association of low unconjugated estriol in the second trimester and adverse pregnancy outcome. **Obstetrics & Gynecology**, v. 91, n. 3, p. 396–400, mar. 1998.
- KRANTZ, D. A.; HALLAHAN, T. W.; CARMICHAEL, J. B. Screening for Open Neural Tube Defects. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 401–406, jun. 2016.
- KRAUS, T. A. et al. Peripheral Blood Cytokine Profiling During Pregnancy and Post-partum Periods. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 6, p. 411–426, dez. 2010.
- KUMAWAT, DR. U.; AMOLSING, DR.; THAKUR, DR. R. To study the status of vitamin b12 deficiency in pregnancy and its impact on the maternal and fetal outcome. **International Journal of Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 5, n. 3, p. 243–255, 1 maio 2021.
- LAI, Z.; KALKUNTE, S.; SHARMA, S. A Critical Role of Interleukin-10 in Modulating Hypoxia-Induced Preeclampsia-Like Disease in Mice. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 505–514, mar. 2011.
- LANGAN, R. C.; GOODBRED, A. J. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. **American family physician**, v. 96, n. 6, p. 384–389, 15 set. 2017.
- LAURENCE, K. M. et al. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. **BMJ**, v. 282, n. 6275, p. 1509–1511, 9 maio 1981.
- LAYDEN, A. J. et al. Vitamin B12 and placental expression of transcobalamin in pregnant adolescents. **Placenta**, v. 45, p. 1–7, set. 2016.

- LEE, W. Cardiorespiratory Alterations During Normal Pregnancy. **Critical Care Clinics**, v. 7, n. 4, p. 763–775, out. 1991.
- LESSEY, B. A. Adhesion molecules and implantation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, n. 1–2, p. 101–112, maio 2002.
- LEVARIO-CARRILLO, M. et al. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 586, n. 1, p. 68–75, set. 2005.
- LI, R. et al. Pericentric inversion in chromosome 1 and male infertility. **Open Medicine**, v. 15, n. 1, p. 343–348, 20 abr. 2020.
- LI, R.; ZHU, J. Effects of aneuploidy on cell behaviour and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 4, p. 250–265, 5 abr. 2022.
- LINDBLAD, B. et al. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 84, n. 11, p. 1055–1061, nov. 2005.
- LINDENBAUM, R. H. et al. Trisomy 18 and maternal serum amniotic fluid alpha-fetoprotein. **Prenatal Diagnosis**, v. 7, p. 511–519, 1987.
- LINDHEIMER, M. D.; DAVIDSON, J. M.; KATZ, A. I. The kidney and hypertension in pregnancy: Twenty exciting years. **Seminars in Nephrology**, v. 21, n. 2, p. asnep0210173, mar. 2001.
- LINDSTRÖM, T. M.; BENNETT, P. R. The role of nuclear factor kappa B in human labour. **Reproduction**, v. 130, n. 5, p. 569–581, nov. 2005.
- LIU, A.-X. et al. Physiology of Embryonic Development. Em: **Gamete and Embryo-fetal Origins of Adult Diseases**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 39–59.
- LIU, L. et al. Telomere lengthening early in development. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 1436–1441, 4 dez. 2007.
- LIU, S. et al. The role of decidual immune cells on human pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 124, p. 44–53, nov. 2017.
- LOANE, M. et al. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 1, p. 27–33, 20 jan. 2013.
- LOCKWOOD, C. J. et al. Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in First Trimester Human Decidual Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p. 445–452, fev. 2006.

LONCAR, D.; VARJACIC, M.; ARSENIJEVIC, S. Significance of pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-a) concentration determination in the assessment of final outcome of pregnancy. **Vojnosanitetski pregled**, v. 70, n. 1, p. 46–50, 2013.

LOPE, V. et al. Cytogenetic status in newborns and their parents in Madrid: The BioMadrid study. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 267-277, 2009.

LÓPEZ-CAMELO, J. S.; CASTILLA, E. E.; ORIOLI, I. M. Folic acid flour fortification: Impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152A, n. 10, p. 2444–2458, out. 2010.

LOUKOGEORGAKIS, S. P.; DE COPPI, P. Concise Review: Amniotic Fluid Stem Cells: The Known, the Unknown, and Potential Regenerative Medicine Applications. **Stem Cells**, v. 35, n. 7, p. 1663–1673, 1 jul. 2017.

LUND, C. J.; DONOVAN, J. C. Blood volume during pregnancy. Significance of plasma and red cell volumes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 98, n. 3, p. 394–403, 1 jun. 1967.

LUO, Y. et al. Different segregation patterns in five carriers due to a pericentric inversion of chromosome 1. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 6, p. 367–372, 6 dez. 2014.

LYLE, R. et al. Genotype–phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 4, p. 454–466, 12 abr. 2009.

MACFARLANE, A. J. et al. Dietary folic acid protects against genotoxicity in the red blood cells of mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 779, p. 105–111, set. 2015.

MACKENZIE, K. J. et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. **Nature**, v. 548, n. 7668, p. 461–465, 24 ago. 2017.

MAESTRI, D. et al. **Artigo Original Artigo Original Artigo Original Artigo Original Artigo Original** *Rev Ass Med Brasil*. [s.l: s.n.].

MAKEDOS, G. et al. Homocysteine, folic acid and B12 serum levels in pregnancy complicated with preeclampsia. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 275, n. 2, p. 121–124, 15 jan. 2007.

MALAMITSI-PUCHNER, A. et al. Elevated Second Trimester Amniotic Fluid Interferon γ -Inducible T-Cell α Chemoattractant Concentrations as a Possible Predictor of Preterm Birth. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 13, n. 1, p. 25–29, 28 jan. 2006.

- MALONE, F. D. et al. First-Trimester Septated Cystic Hygroma. **Obstetrics & Gynecology**, v. 106, n. 2, p. 288–294, ago. 2005.
- MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 124, n. 1, p. 71–75, jan. 2001.
- MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2011.
- MAROUN, L. E.; HEFFERNAN, T. N.; HALLAM, D. M. Partial IFN-alpha/beta and IFN-gamma Receptor Knockout Trisomy 16 Mouse Fetuses Show Improved Growth and Cultured Neuron Viability. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 20, n. 2, p. 197–204, fev. 2000.
- MARSHALL, N. E. et al. The importance of nutrition in pregnancy and lactation: lifelong consequences. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 226, n. 5, p. 607–632, maio 2022.
- MARTENS, H. B. M. W. D. J. J.-H. Microbial production of vitamin B 12. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 275–285, 1 mar. 2002.
- MARTTALA, J. et al. Low maternal PAPP-A is associated with small-for-gestational age newborns and stillbirths. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 89, n. 9, p. 1226–1228, set. 2010.
- MASHIYAMA, S. T. et al. Uracil in DNA, determined by an improved assay, is increased when deoxynucleosides are added to folate-deficient cultured human lymphocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 330, n. 1, p. 58–69, jul. 2004.
- MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailability. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 4, p. 529–536, 7 nov. 2004.
- MEDINA MA; URDIALES JL; AMORES-SANCHES MI. **Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions** Eur. J. Biochem. [s.l: s.n.].
- MÉNÉZO, Y.; DALE, B.; COHEN, M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 357–365, 21 nov. 2010.
- MERKATZ, I. R. et al. An association between low maternal serum α -fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 148, n. 7, p. 886–894, abr. 1984.
- MEYER, R. E. et al. Survival of children with trisomy 13 and trisomy 18: A multi-state population-based study. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 170, n. 4, p. 825–837, abr. 2016.

- MILIĆ, M. et al. Correlation between folate and vitamin B₁₂ and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. **Acta biochimica Polonica**, v. 57, n. 3, p. 339–45, 2010.
- MILLACURA, N. et al. Effects of folic acid fortification on orofacial clefts prevalence: a meta-analysis. **Public Health Nutrition**, v. 20, n. 12, p. 2260–2268, 23 ago. 2017.
- MILLER, R. K. et al. The Role of the Human Placenta in Embryonic Nutrition. Impact of Environmental and Social Factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 678, n. 1 Maternal Nutr, p. 92–107, mar. 1993.
- MILLS, J. L. et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. **The Lancet**, v. 345, n. 8943, p. 149–151, jan. 1995.
- MILMAN, N. et al. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women. **European Journal of Haematology**, v. 76, n. 6, p. 521–525, 17 jun. 2006.
- MINOZZO, R.; DEIMLING, L. I.; SANTOS-MELLO, R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B₁₂ status. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 697, n. 1–2, p. 24–32, mar. 2010.
- MIRANDA, J. A.; MATTEVI, M. S. **Técnicas de bandeamento e coloração cromossômica**. Citogenética Humana ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MITCHELL, L. E. Epidemiology of neural tube defects. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 135C, n. 1, p. 88–94, 15 maio 2005.
- MITCHELL, M.; TRAUTMAN, M.; DUDLEY, D. Cytokine networking in the placenta. **Placenta**, v. 14, n. 3, p. 249–275, maio 1993.
- MIZEJEWSKI, G. J. Levels of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Early Infancy in Normal and Disease States. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 58, n. 12, p. 804–826, dez. 2003.
- MIZEJEWSKI, G. J. Biological Roles of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Perinatal Development. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n. 6, p. 439–463, 29 jun. 2004.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–663, 1 set. 2002.
- MOGNATO, M.; BURDAK-ROTHKAMM, S.; ROTHKAMM, K. Interplay between DNA replication stress, chromatin dynamics and DNA-damage response for the maintenance of genome stability. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 787, p. 108346, jan. 2021.

MOLITCH, M. E. Prolactinoma in pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 885–896, dez. 2011.

MOLLOY, A. M. et al. Maternal Vitamin B12 Status and Risk of Neural Tube Defects in a Population With High Neural Tube Defect Prevalence and No Folic Acid Fortification. **Pediatrics**, v. 123, n. 3, p. 917–923, 1 mar. 2009.

MOLLOY, A. M. Should vitamin B12 status be considered in assessing risk of neural tube defects? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1414, n. 1, p. 109–125, fev. 2018.

MONTAGNANA, M. et al. Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17–18, p. 1515–1520, ago. 2011.

MONZÓN-BORDONABA, F.; VADILLO-ORTEGA, F.; FEINBERG, R. F. Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor- α : A role in pregnancy establishment and maintenance? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, n. 6, p. 1574–1580, dez. 2002.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia clínica**. 10 Ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MOORE, T. R. The Role of Amniotic Fluid Assessment in Evaluating Fetal Well-Being. **Clinics in Perinatology**, v. 38, n. 1, p. 33–46, mar. 2011.

MOR, G. Inflammation and Pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, n. 1, p. 121–128, abr. 2008.

MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 80–87, mar. 2011.

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 8, p. 469–482, 19 ago. 2017.

MORAWIEC, Z. et al. DNA damage and repair in children with Down's syndrome. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 637, n. 1–2, p. 118–123, jan. 2008.

MORRIS, J. K. et al. Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome: England and Wales 1989-2009. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158A, n. 5, p. 1151–1157, maio 2012.

MORSE, N. L. Benefits of Docosahexaenoic Acid, Folic Acid, Vitamin D and Iodine on Foetal and Infant Brain Development and Function Following Maternal Supplementation during Pregnancy and Lactation. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 799–840, 24 jul. 2012.

MOTTOLA, F. et al. DNA Damage in Human Amniotic Cells: Antigenotoxic Potential of Curcumin and α -Lipoic Acid. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1137, 17 jul. 2021.

MULLER, F. et al. Maternal serum human chorionic gonadotropin level at fifteen weeks is a predictor for preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 175, n. 1, p. 37–40, jul. 1996.

MURPHY, M. M. et al. The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 614–619, 1 set. 2002.

MURPHY, M. M.; FERNANDEZ-BALLART, J. D. Homocysteine in Pregnancy. **Adv Clin Chem**, v. 53, p. 105–137, 2011.

MURPHY, S.; ATALA, A. Amniotic Fluid and Placental Membranes: Unexpected Sources of Highly Multipotent Cells. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 31, n. 01, p. 062–068, 17 jan. 2013.

MURPHY, S. P. et al. Uterine NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 4084–4090, 15 set. 2005.

MURPHY, S. P. et al. Interferon Gamma in Successful Pregnancies1. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 848–859, 1 maio 2009.

MURRAY, M. J.; NICHOLSON, J. C. -Fetoprotein. **Archives of Disease in Childhood - Education and Practice**, v. 96, n. 4, p. 141–147, 7 jul. 2011.

MUTHAYYA, S. et al. The relationship of neonatal serum vitamin B12 status with birth weight. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 15, n. 4, p. 538–43, 2006a.

MUTHAYYA, S. et al. Low maternal vitamin B12 status is associated with intrauterine growth retardation in urban South Indians. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 791–801, 1 jun. 2006b.

MUTTON, D.; ALBERMAN, E.; HOOK, E. B. Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists. **Journal of Medical Genetics**, v. 33, n. 5, p. 387–394, 1 maio 1996.

MUTTUKRISHNA, S. Role of Inhibin in Normal and High-Risk Pregnancy. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 22, n. 3, p. 227–234, ago. 2004.

NADERI, N.; HOUSE, J. D. Recent Developments in Folate Nutrition. Em: [s.l: s.n.]. p. 195–213.

NADIN, S. B.; VARGAS–ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183–1186, 26 set. 2001.

NAKABAYASHI, M. et al. Elevated IL-6 in Midtrimester Amniotic Fluid Is Involved with the Onset of Preeclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, n. 5, p. 329–334, maio 1998.

NELSON, M. M.; PETERSEN, E. M. Prospective screening for down syndrome using maternal serum AFP. **The Lancet**, v. 325, n. 8440, p. 1280–1281, jun. 1985.

NEWBY, D. et al. The pathophysiology of Down's syndrome pregnancies. **Early Human Development**, v. 47, p. S67–S68, dez. 1996.

NEWBY, D. et al. Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. **Placenta**, v. 26, n. 2–3, p. 190–200, fev. 2005.

NEXO, E.; HOFFMANN-LÜCKE, E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 359S-365S, jul. 2011.

NICOLAIDES, K. H. et al. Fetal Nuchal Oedema: Associated Malformations and Chromosomal Defects. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 7, n. 2, p. 123–131, 1992.

NICOLAIDES, K. H. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 1, p. 45–67, jul. 2004.

NICOLAIDES, K. H. et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 25, n. 3, p. 221–226, 25 mar. 2005.

NICOLAIDES, K. H. ; SEBIRE, N. J.; SNIJDERS, R. J. M. “The 11-13 weeks scan.” **Fetal Medicine Foundation**, p. 71–88, 2004.

NIELSEN, J. et al. Sex ratio in Down syndrome. **Annales de genetique**, v. 24, n. 4, p. 212–5, 1981.

NIELSEN, M. J. et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells—a sophisticated, multistep pathway. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 6, p. 345–354, 1 jun. 2012.

NIH. **National Human Genome Research Institute. KARYOTYPE.**

NORIEGA, M. A.; SIDDIK, A. B. **Trisomy 13**. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls, 2023.

NORTHCOTE, R. J.; KNIGHT, P. V.; BALLANTYNE, D. Systolic murmurs in pregnancy: Value of echocardiographic assessment. **Clinical Cardiology**, v. 8, n. 6, p. 327–328, jun. 1985.

NORTHRUP, H.; VOLCIK, K. A. Spina bifida and other neural tube defects. **Current Problems in Pediatrics**, v. 30, n. 10, p. 317–332, nov. 2000.

NORWITZ, E. R. et al. Molecular Regulation of Parturition: The Role of the Decidual Clock. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 11, p. a023143, nov. 2015.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OBEID, R. et al. Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 1, p. 133–139, 1 jul. 2005.

OBIEKWE, B. C. et al. Maternal and fetal alphafetoprotein (AFP) levels at term: Relation to sex, weight and gestation of the infant. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 64, n. 3, p. 251–253, jan. 1985.

OGILVIE, C. M. et al. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 112, n. 10, p. 1369–1375, out. 2005.

O'LEARY, F.; SAMMAN, S. Vitamin B12 in Health and Disease. **Nutrients**, v. 2, n. 3, p. 299–316, 5 mar. 2010.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 23–29, 27 jun. 2006.

ONALAN, R. et al. Combining 2nd-Trimester Maternal Serum Homocysteine Levels and Uterine Artery Doppler for Prediction of Preeclampsia and Isolated Intrauterine Growth Restriction. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 61, n. 3, p. 142–148, 2006.

ORIOLO, I. M. et al. Effects of folic acid fortification on spina bifida prevalence in Brazil. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, n. 9, p. 831–835, set. 2011.

OSOL, G.; KO, N. L.; MANDALÁ, M. Plasticity of the Maternal Vasculature During Pregnancy. **Annual Review of Physiology**, v. 81, n. 1, p. 89–111, 10 fev. 2019.

- OWEN, E. P. et al. Hyperhomocysteinemia - A risk factor for abruptio placentae. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, n. 3, p. 359–362, jul. 1997.
- PALM, M. et al. F2-Isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. **Free Radical Research**, v. 43, n. 6, p. 546–552, 21 jan. 2009.
- PALM, M. et al. Involvement of inflammation in normal pregnancy. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 92, n. 5, p. 601–605, maio 2013.
- PÁLMAI-PALLAG, T.; BACHRATI, C. Z. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 10, p. 822–832, out. 2014.
- PALMER, S. K. et al. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. **Obstetrics and gynecology**, v. 80, n. 6, p. 1000–6, dez. 1992.
- PALOMAKI, G. E. et al. Second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels in pregnancies associated with gastroschisis and omphalocele. **Obstetrics and gynecology**, v. 71, n. 6 Pt 1, p. 906–9, jun. 1988.
- PANDEY, P.; VERMA, R. K. A Brief Overview on Autosomal Trisomies. Em: **Recent Developments in Medicine and Medical Research Vol. 15**. [s.l.] Book Publisher International (a part of SCIENCEDOMAIN International), 2021. p. 38–56.
- PARRY, E.; SHIELDS, R.; TURNBULL, A. C. TRANSIT TIME IN THE SMALL INTESTINE IN PREGNANCY. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 77, n. 10, p. 900–901, out. 1970.
- PATAU, K. et al. MULTIPLE CONGENITAL ANOMALY CAUSED BY AN EXTRA AUTOSOME. **The Lancet**, v. 275, n. 7128, p. 790–793, abr. 1960.
- PATIL, M.; PANCHANADIKAR, T. M.; WAGH, G. Variation of Papp-A Level in the First Trimester of Pregnancy and Its Clinical Outcome. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 64, n. 2, p. 116–119, 1 abr. 2014.
- PAWLAK, R.; LESTER, S. E.; BABATUNDE, T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 5, p. 541–548, 26 maio 2014.
- PEDERSEN, M. et al. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. **Environmental Research**, v. 109, n. 8, p. 1012–1020, nov. 2009.

- PEÑA-ROSAS, J. P.; VITERI, F. E. Effects of routine oral iron supplementation with or without folic acid for women during pregnancy. Em: PEÑA-ROSAS, J. P. (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- PEREZ-D'GREGORIO, R. E.; MILLER, R. K. Transport and endogenous release of vitamin B12 in the dually perfused human placenta. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, n. 3, p. S35–S42, mar. 1998.
- PEROOS, S. et al. Longevity and Patau syndrome: what determines survival? **Case Reports**, v. 2012, n. dec06 1, p. bcr0620114381–bcr0620114381, 6 dez. 2012.
- PERRONE, S. et al. Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 177–180, fev. 2007.
- PETIT, F. M. et al. A new mutation in the AFP gene responsible for a total absence of alpha fetoprotein on second trimester maternal serum screening for Down syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 3, p. 387–390, 15 mar. 2009.
- PETRY, P. et al. Clinical features and prognosis of a sample of patients with trisomy 13 (Patau syndrome) from Brazil. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 161, n. 6, p. 1278–1283, jun. 2013.
- PICCINNI, M.-P. T-cell Cytokines in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 5, p. 289–294, maio 2002.
- PIETRZIK, K.; BAILEY, L.; SHANE, B. Folic Acid and L-5-Methyltetrahydrofolate. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 8, p. 535–548, ago. 2010.
- PISAL, H. et al. Higher maternal plasma folate, vitamin B12 and homocysteine levels in women with preeclampsia. **Journal of Human Hypertension**, v. 33, n. 5, p. 393–399, 1 maio 2019.
- PITKIN, R. M. Folate and neural tube defects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 285S-288S, jan. 2007.
- PLAKS, V. et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 20 nov. 2008.
- PLEVYAK, M. et al. Deficiency of Decidual IL-10 in First Trimester Missed Abortion: A Lack of Correlation with the Decidual Immune Cell Profile. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 4, p. 242–250, abr. 2002.
- POLARI, L. et al. Increase in serum Interleukin-10 does not alleviate pro-inflammatory MCP-1 production in obese pregnancies. **Cytokine**, v. 108, p. 67–70, ago. 2018.

POLGÁR, K. et al. Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. **American journal of human genetics**, v. 45, n. 5, p. 786–92, nov. 1989.

POTDAR, N. et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 116, n. 5, p. 637–642, abr. 2009.

POWERS, R. W. et al. Renal Handling of Homocysteine During Normal Pregnancy and Preeclampsia. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, n. 1, p. 45–50, 28 jan. 2004.

PULIKKUNNEL, S. T.; THOMAS, S. V. Neural tube defects: pathogenesis and folate metabolism. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 53, p. 127–35, fev. 2005.

PUNTACHAI, P. et al. Associations between pregnancy outcomes and unexplained high and low maternal serum alpha-fetoprotein levels. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 292, n. 1, p. 81–85, 30 jul. 2015.

RAINA, S. et al. How common is Vitamin B12 deficiency - A report on deficiency among healthy adults from a medical college in rural area of North-West India. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 4, n. 4, p. 241, 2014.

RAMAN, R. S. et al. Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection*. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 831–835, maio 2001.

RANDHAWA, R.; COHEN, P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, n. 1–2, p. 84–90, set. 2005.

RANTA, J. K. et al. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 48–52, jul. 2011.

RASMUSSEN, S. A. et al. Population-Based Analyses of Mortality in Trisomy 13 and Trisomy 18. **Pediatrics**, v. 111, n. 4, p. 777–784, 1 abr. 2003.

RAY, J. G. et al. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. **The Lancet**, v. 360, n. 9350, p. 2047–2048, dez. 2002.

RAY, J. G. et al. Prevalence of trisomy 21 following folic acid food fortification. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 120A, n. 3, p. 309–313, 30 jul. 2003.

- RAYBURN, W. F.; JOLLEY, J. A.; SIMPSON, L. L. Advances in ultrasound imaging for congenital malformations during early gestation. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 103, n. 4, p. 260–268, abr. 2015.
- REFSUM, H. et al. Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu. Rev. Medicine**, v. 49, p. 31-62, 1998.
- REFSUM, H. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S2, p. S109, maio 2001.
- RIEDER, M. J. Prevention of neural tube defects with periconceptional folic acid. **Clinics in perinatology**, v. 21, n. 3, p. 483–503, set. 1994.
- ROBBINS, J. R. et al. Placental Syncytiotrophoblast Constitutes a Major Barrier to Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000732, 22 jan. 2010.
- ROBERTS, J. M.; REDMAN, C. W. G. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. **The Lancet**, v. 341, n. 8858, p. 1447–1451, jun. 1993.
- ROBERTS, L. J. et al. First trimester fetal nuchal translucency: Problems with screening the general population 1. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 102, n. 5, p. 381–385, maio 1995.
- ROBERTSON, S. A.; CARE, A. S.; SKINNER, R. J. Interleukin 10 Regulates Inflammatory Cytokine Synthesis to Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Abortion and Fetal Growth Restriction in Mice. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 5, p. 738–748, 1 maio 2007.
- ROBERTSON, S. A.; SKINNER, R. J.; CARE, A. S. Essential Role for IL-10 in Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Preterm Labor in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4888–4896, 1 out. 2006.
- ROBSON, S. C. et al. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 256, n. 4, p. H1060–H1065, 1 abr. 1989.
- ROIZ-HERNÁNDEZ, J.; CABELLO-MARTÍNEZ, J. DE J.; FERNÁNDEZ-MEJÍA, M. Human chorionic gonadotropin levels between 16 and 21 weeks of pregnancy and prediction of pre-eclampsia. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 92, n. 2, p. 101–105, fev. 2006.
- ROMERO, R. et al. Sonographically monitored amniocentesis to decrease intraoperative complications. **Obstetrics and gynecology**, v. 65, n. 3, p. 426–30, mar. 1985.
- ROMERO, R. et al. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, n. 5, p. 1576–1587, maio 1992.

- ROMERO, R. et al. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 6, p. 1509–1519, jun. 2004.
- ROMERO, R. et al. Inflammation in Pregnancy: Its Roles in Reproductive Physiology, Obstetrical Complications, and Fetal Injury. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. S194–S202, 28 jun. 2008.
- RONNENBERG, A. G. et al. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1385–1391, dez. 2002.
- ROOT, S.; CAREY, J. C. Survival in trisomy 18. **American Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 2, p. 170–174, 15 jan. 1994.
- ROSANO, A. Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 54, n. 9, p. 660–666, 1 set. 2000.
- ROSE, N. C.; MENNUTI, M. T. Maternal serum screening for neural tube defects and fetal chromosome abnormalities. **The Western journal of medicine**, v. 159, n. 3, p. 312–7, set. 1993.
- ROSSI, A. C.; PREFUMO, F. **Accuracy of ultrasonography at 11-14 weeks of gestation for detection of fetal structural anomalies: A systematic review. Obstetrics and Gynecology**, dez. 2013.
- ROTHENBERG, S. P. et al. Autoantibodies against Folate Receptors in Women with a Pregnancy Complicated by a Neural-Tube Defect. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 2, p. 134–142, 8 jan. 2004.
- ROZEN, R. Molecular genetic aspects of hyperhomocysteinemia and its relation to folic acid. **Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale**, v. 19, n. 3, p. 171–8, jun. 1996.
- RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of Gestational Hormones in the Induction of Insulin Resistance*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, n. 2, p. 341–347, ago. 1988.
- SADLER, T. **Langman Embriologia Médica**. 13 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. v. 13
- SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 17 mar. 2010.

- SAMONTE, R. V. et al. Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. **Human Genetics**, v. 98, n. 5, p. 576–580, 26 set. 1996.
- SANTAGUIDA, S. et al. Chromosome Mis-segregation Generates Cell-Cycle-Arrested Cells with Complex Karyotypes that Are Eliminated by the Immune System. **Developmental Cell**, v. 41, n. 6, p. 638- 651.e5, jun. 2017.
- SANTOS, L. M. P. et al. Prevention of neural tube defects by the fortification of flour with folic acid: a population-based retrospective study in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 1, p. 22–29, 1 jan. 2016.
- SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 15 mar. 2010.
- SCAIFE, P. J.; MOHAUPT, M. G. Salt, aldosterone and extrarenal Na⁺ - sensitive responses in pregnancy. **Placenta**, v. 56, p. 53–58, ago. 2017.
- SCHLEIFER, R. A. et al. Pregnancy outcome for women with very low levels of maternal serum unconjugated estriol on second-trimester screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 173, n. 4, p. 1152–1156, out. 1995.
- SCHNEIDER, H.; MILLER, R. K. Receptor-mediated uptake and transport of macromolecules in the human placenta. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 367–375, 2010.
- SCHOENWOLF, G. C. et al. **Larsen Embriologia Humana**. 5 Ed ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- SCHOENWOLF, G. C.; FRANKS, M. V. Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. **Developmental Biology**, v. 105, n. 2, p. 257–272, out. 1984.
- SCHOLL, T. O.; JOHNSON, W. G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1295S-1303S, maio 2000.
- SCHWARTZ, R. S. Autoimmune Folate Deficiency and the Rise and Fall of “Horror Autotoxicus”. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 19, p. 1948–1950, 12 maio 2005.
- SCOTT, J. THE METHYL FOLATE TRAP A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid-induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. **The Lancet**, v. 318, n. 8242, p. 337–340, ago. 1981.

SELEVAN, S. G.; KIMMEL, C. A.; MENDOLA, P. Identifying critical windows of exposure for children's health. **Environmental health perspectives**, v. 108 Suppl 3, p. 451–5, jun. 2000.

SELHUB, J. HOMOCYSTEINE METABOLISM. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 217–246, jul. 1999.

SEQUEIRA, J. M.; RAMAEKERS, V. TH.; QUADROS, E. V. The diagnostic utility of folate receptor autoantibodies in blood. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 3, 1 jan. 2013.

SERIN, S. Retrospective analysis of the results of amniocentesis procedure at an university clinic. **Perinatal Journal**, v. 21, n. 2, p. 47–52, 1 ago. 2013.

SEYED M. HOSEINI et al. Human Amniocytes: a Comprehensive Study on Morphology, Frequency and Growth Properties of Subpopulations from a Single Clone to the Senescence. **Cell and Tissue Biology**, v. 14, n. 2, p. 102–112, 13 mar. 2020.

SHANE, B.; STOKSTAD, E. L. R. Vitamin B12-Folate Interrelationships. **Annual Review of Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 115–141, jul. 1985.

SHARONY, R. et al. Congenital deficiency of alpha-fetoprotein and associated chromosomal abnormality in the placenta. **American Journal of Medical Genetics**, v. 121A, n. 2, p. 113–117, 30 ago. 2003.

SHARONY, R. et al. Is the ratio of maternal serum to amniotic fluid AFP superior to serum levels as a predictor of pregnancy complications? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 293, n. 4, p. 767–770, 9 abr. 2016.

SHI, W.-H. et al. Different Strategies of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies in Women of Advanced Maternal Age: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 17, p. 3895, 30 ago. 2021.

SIITERI, P. K.; MACDONALD, P. C. Placental Estrogen Biosynthesis During Human Pregnancy¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 7, p. 751–761, jul. 1966.

SILINI, A. R. et al. Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 17 dez. 2020.

SIMON, L. et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. **Human Reproduction**, v. 25, n. 7, p. 1594–1608, 1 jul. 2010.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.

ŠÍPEK, A. et al. Pericentric Inversion of Human Chromosome 9 Epidemiology Study in Czech Males and Females. **Folia biologica**, v. 61, n. 4, p. 140–6, 2015.

SKONER, J. M.; SIGMON, J.; LARCOM, L. L. Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 108, n. 1–2, p. 179–183, fev. 1995.

SKRZYPEK, H.; HUI, L. **Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology** Bailliere Tindall Ltd, , 1 jul. 2017.

SLONIM, D. K. et al. Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down syndrome fetuses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 23, p. 9425–9429, 9 jun. 2009.

SMITH, A. et al. Thyroid disorders in pregnancy and postpartum. **Australian Prescriber**, v. 40, n. 6, p. 214–219, 4 dez. 2017.

SMITH, A. D. The Worldwide Challenge of the Dementias: A Role for B Vitamins and Homocysteine? **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S143–S172, 22 jun. 2008.

SMITH, G. C. S. First-Trimester Determination of Complications of Late Pregnancy. **JAMA**, v. 303, n. 6, p. 561, 10 fev. 2010.

SMRCEK, J. et al. The evaluation of cardiac biometry in major cardiac defects detected in early pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 268, n. 2, p. 94–101, jun. 2003.

SNIJTERS, R. et al. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. **The Lancet**, v. 352, n. 9125, p. 343–346, ago. 1998.

SOLANKY, N. et al. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. **Placenta**, v. 31, n. 2, p. 134–143, fev. 2010.

SONEK, J. D.; NICOLAIDES, K. H. Prenatal ultrasonographic diagnosis of nasal bone abnormalities in three fetuses with Down syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 1, p. 139–141, jan. 2002.

SOUKA, A. P. et al. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, n. 1, p. 9–17, jul. 2001.

SOUKA, A. P. et al. Screening for major structural abnormalities at the 11- to 14-week ultrasound scan. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 2, p. 393–396, fev. 2006.

- SPEKTOR, A.; UMBREIT, N. T.; PELLMAN, D. Cell Biology: When Your Own Chromosomes Act like Foreign DNA. **Current Biology**, v. 27, n. 22, p. R1228–R1231, nov. 2017.
- SPENCER, K. et al. Temporal Changes in Maternal Serum Biochemical Markers of Trisomy 21 across the First and Second Trimester of Pregnancy. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 6, p. 567–576, 29 nov. 2002.
- SPENCER, K. et al. First trimester maternal serum alpha-fetoprotein is not raised in pregnancies with open spina bifida. **Prenatal Diagnosis**, v. 34, n. 2, p. 168–171, fev. 2014.
- SPENCER, K.; COWANS, N. J.; NICOLAIDES, K. H. Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 1, p. 7–10, jan. 2008.
- SPENCER, K.; WOOD, P. J.; ANTHONY, F. W. Elevated Levels of Maternal Serum Inhibin Immunoreactivity in Second Trimester Pregnancies Affected by Down's Syndrome. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 30, n. 2, p. 219–220, 29 mar. 1993.
- SPONG, C. Y. et al. Elevated maternal serum midtrimester α -fetoprotein levels are associated with fetoplacental ischemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 177, n. 5, p. 1085–1087, nov. 1997.
- SPRINGETT, A. et al. Congenital anomalies associated with trisomy 18 or trisomy 13: A registry-based study in 16 european countries, 2000-2011. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 167, n. 12, p. 3062–3069, dez. 2015.
- STABLER, S. P. Vitamin B 12 Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 2, p. 149–160, 10 jan. 2013.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. et al. Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. **Am J Obstet Gynecol**, v. 172, p. 1436–1441, 1995.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. et al. Maternal hyperhomocysteinemia: A risk factor for neural-tube defects? **Metabolism**, v. 43, n. 12, p. 1475–1480, dez. 1994.
- STOKKELAND, L. M. T. et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. **Cytokine**, v. 119, p. 188–196, jul. 2019.
- SUH, J. R.; HERBIG, A. K.; STOVER, P. J. NEW PERSPECTIVES ON FOLATE CATABOLISM. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 255–282, jul. 2001.
- SULLIVAN, K. D. et al. Trisomy 21 consistently activates the interferon response. **eLife**, v. 5, 29 jul. 2016.

- SUZUKI, Y. et al. Evaluation Levels of Cytokines in Amniotic Fluid of Women with Intrauterine Infection in the Early Second Trimester. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 21, n. 1, p. 45–50, 2006.
- SVENSSON-ARVELUND, J. et al. The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 4, p. 1534–1544, 15 fev. 2015.
- TAPARIA, S. et al. Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v. 45, n. 12, 1 jan. 2007.
- TARANTO, M. P. et al. Lactobacillus reuteri CRL1098 Produces Cobalamin. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 18, p. 5643–5647, 15 set. 2003.
- THAKKAR, K.; BILLA, G. Treatment of vitamin B12 deficiency—Methylcobalamine? Cyancobalamine? Hydroxocobalamine?—clearing the confusion. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 1, p. 1–2, 13 jan. 2015.
- THAXTON, J. E.; SHARMA, S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 482–491, 16 fev. 2010.
- THOMAS, R. L.; BLAKEMORE, K. J. Evaluation of elevations in maternal serum alpha-fetoprotein: a review. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 45, n. 5, p. 269–83, maio 1990.
- TIAN, Y.; ISHIKAWA, H.; YAMAUCHI, T. Analysis of cytogenetic and developmental effects on pre-implantation, mid-gestation and near-term mouse embryos after treatment with trichlorfon during zygote stage. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 471, n. 1–2, p. 37–44, nov. 2000.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 6 jun. 2000.
- TOLMACHEVA, E. N.; VASILYEV, S. A.; LEBEDEV, I. N. Aneuploidy and DNA Methylation as Mirrored Features of Early Human Embryo Development. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1084, 17 set. 2020.
- TONG, X.-L. et al. Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development—Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 72, n. 7, p. 368–373, jul. 2009.
- TRAN, H. A. Abnormal Laboratory Results: Biochemical tests for abnormalities in pregnancy. **Australian Prescriber**, v. 29, n. 2, p. 48–52, 1 abr. 2006.

TSIGKOU, A. et al. Inhibins as Diagnostic Markers in Human Reproduction. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–29.

TSITSIOU, E. et al. Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 16, p. 4001–4013, 15 ago. 2009.

TUCKER, J. M. et al. Prenatal differentiation of ventral abdominal wall defects. Are amniotic fluid markers useful adjuncts? **The Journal of reproductive medicine**, v. 37, n. 5, p. 445–8, maio 1992.

TYSON, J. E. et al. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 113, n. 1, p. 14–20, maio 1972.

UELAND, K. Maternal cardiovascular dynamics. VII. Intrapartum blood volume changes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 126, n. 6, p. 671–7, 15 nov. 1976.

ULRICH, C. M.; REED, M. C.; NIJHOUT, H. F. Modeling folate, one-carbon metabolism, and DNA methylation. **Nutrition Reviews**, v. 66, p. S27–S30, 29 jul. 2008.

UNDERWOOD, M. A.; GILBERT, W. M.; SHERMAN, M. P. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. **Journal of Perinatology**, v. 25, n. 5, p. 341–348, 1 maio 2005.

VAN LITH, J. M. M. et al. Alpha-fetoprotein in fetal serum, amniotic fluid, and maternal serum. **Prenatal Diagnosis**, v. 11, n. 8, p. 625–628, 21 ago. 1991.

VAN LITH, J. M. M. et al. Second-trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome. **Prenatal Diagnosis**, v. 12, n. 10, p. 801–806, out. 1992.

VAN LITH, J. M.; MANTINGH, A.; PRATT, J. J. First-trimester maternal serum immunoreactive inhibin in chromosomally normal and abnormal pregnancies. Dutch Working Party on Prenatal Diagnosis. **Obstetrics and gynecology**, v. 83, n. 5 Pt 1, p. 661–4, maio 1994.

VAN MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 1, p. 4–19, 1 jan. 2009.

VAN STRAATEN, H. W. M. et al. Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic. **Developmental Dynamics**, v. 207, n. 3, p. 309–318, nov. 1996.

VASSILIADIS, S. et al. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 2, p. 69–72, 1998.

VERMA, R. S.; HUQ, A. Sex ratio of children with trisomy 21 or Down syndrome. **Cytobios**, v. 51, n. 206–207, p. 145–8, 1987.

- VESCE, F. et al. **Cytokine imbalance in pregnancies with fetal chromosomal abnormalities** Cherouny and Pankuch. [s.l.] Tanaka and Narahara, 2002.
- VOLLSET, S. E. et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 962–968, 1 abr. 2000.
- WALD, N. J. et al. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 95, n. 4, p. 334–341, abr. 1988.
- WALKER, M. C. et al. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 180, p. 660–664, 1999.
- WALLACE, E. M. et al. Evaluation of maternal serum immunoreactive inhibin as a first trimester marker of Down's syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 41, n. 4, p. 483–486, out. 1994.
- WALLINGFORD, J. B. et al. The Continuing Challenge of Understanding, Preventing, and Treating Neural Tube Defects. **Science**, v. 339, n. 6123, mar. 2013.
- WATANABE, F. Vitamin B 12 Sources and Bioavailability. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 10, p. 1266–1274, 26 nov. 2007.
- WEEKES, E. W. et al. Nutrient Levels in Amniotic Fluid from Women with Normal and Neural Tube Defect Pregnancies. **Neonatology**, v. 61, n. 4, p. 226–231, 1992.
- WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353–356, jul. 1993.
- WEISSENBACHER, T. et al. Influence of maternal age, gestational age and fetal gender on expression of immune mediators in amniotic fluid. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 375, 24 dez. 2012.
- WENSTROM, K. D. et al. Role of Amniotic Fluid Homocysteine Level and of Fetal 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Genotype in the Etiology of Neural Tube Defects. **Am. J. Med. Genet.** v. 90, p. 12-16, 2000.
- WENSTROM, K. D. et al. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 184, n. 5, p. 806–817, abr. 2001.
- WHITTAKER, P.; MACPHAIL, S.; LIND, T. Serial hematologic changes and pregnancy outcome. **Obstetrics & Gynecology**, v. 88, n. 1, p. 33–39, jul. 1996.

WHO. **Congenital disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/birth-defects>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

WILHELM, T.; SAID, M.; NAIM, V. DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. **Genes**, v. 11, n. 6, p. 642, 10 jun. 2020.

WILSON, A. et al. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 67, n. 4, p. 317–323, ago. 1999.

WILSON, R. D. et al. RETIRED: Pre-conceptional Vitamin/Folic Acid Supplementation 2007: The Use of Folic Acid in Combination With a Multivitamin Supplement for the Prevention of Neural Tube Defects and Other Congenital Anomalies. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 29, n. 12, p. 1003–1013, dez. 2007.

WRIGHT, D. et al. First-Trimester Screening for Trisomies 21, 18 and 13 by Ultrasound and Biochemical Testing. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 35, n. 2, p. 118–126, 2014.

WU, F.-Y. et al. Associations among genetic susceptibility, DNA damage, and pregnancy outcomes of expectant mothers exposed to environmental tobacco smoke. **Science of The Total Environment**, v. 386, n. 1–3, p. 124–133, nov. 2007.

WYLLIE, J. P. et al. Natural history of trisomy 13. **Archives of Disease in Childhood**, v. 71, n. 4, p. 343–345, 1 out. 1994.

YANG, Q. et al. Folic acid source, usual intake, and folate and vitamin B-12 status in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2006. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 64–72, jan. 2010.

YARON, Y. et al. Second-trimester maternal serum marker screening: Maternal serum α -fetoprotein, β -human chorionic gonadotropin, estriol, and their various combinations as predictors of pregnancy outcome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, n. 4, p. 968–974, out. 1999.

YASUDA, S. et al. Placental Folate Transport during Pregnancy. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 2277–2284, 23 set. 2008.

YATES, J. R. W. et al. Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects? **Clinical Genetics**, v. 31, n. 5, p. 279–287, 28 jun. 1987.

YEOMANS, E. R.; GILSTRAP, L. C. Physiologic changes in pregnancy and their impact on critical care. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. Supplement, p. S256–S258, out. 2005.

YOCKEY, L. J.; IWASAKI, A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. **Immunity**, v. 49, p. 397–412, 2018.

YOON, B. H. et al. Amniotic fluid interleukin-6: A sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity.

American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 172, n. 3, p. 960–970, mar. 1995.

YOSHINAGA, K. Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 2, p. 161–169, abr. 2008.

ZANA, M. et al. Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 2, p. 726–733, jun. 2006.

ZARZOUR, S. J. et al. Abnormal maternal serum alpha fetoprotein and pregnancy outcome. **The Journal of Maternal-Fetal Medicine**, v. 7, n. 6, p. 304–307, nov. 1998.

ZENCLUSSEN, A. C.; HÄMMERLING, G. J. Cellular Regulation of the Uterine Microenvironment That Enables Embryo Implantation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 17 jun. 2015.

ZENG, Y.; CHEN, T. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. **Genes**, v. 10, n. 4, p. 257, 29 mar. 2019.

ZHANG, T. et al. Maternal serum vitamin B 12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. **Public Health Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 680–686, 1 maio 2009.

ANEXO A - 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 doutorado de Letícia Kramer Pacheco, 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.

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 Leticia Kramer Pacheco

Assinatura do Pesquisador Responsável Sharbel Weidner Maluf

ANEXO B – 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 doutorado de Leticia Kramer Pacheco, 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 Letícia Kramer Pacheco

Assinatura do Pesquisador Responsável Sharbel Weidner Maluf

ANEXO C - Questionário De Saúde Pessoal

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.

Nome: _____

Data: ____ / ____ / ____

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.

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 () 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 da semana			
	1 a 2	3 a 4	5 a 6	Todos os 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? _____ .

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 D – Aprovação do Comitê de Ética (CEPSH)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE
OXIDATIVO GESTAÇÕES QUE APRESENTAM MALFORMAÇÕES
FETAIS

Pesquisador: Sharbel Weidner Maluf

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 58143416.7.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 09/04/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.621.522

Apresentação da Notificação:

Projeto de mestrado da aluna Flora Troina Maraslis, aluna do Programa de pós-graduação em farmácia da UFSC. Será um estudo transversal que avaliará o estresse oxidativo e instabilidade genômica de sangue periférico e líquido amniótico de gestantes com malformação fetal, submetidas à punção de líquido amniótico para avaliação de cariótipo fetal, atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Amostras de sangue periférico de gestantes com gestação normal e de

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA E ESTRESSE OXIDATIVO
GESTAÇÕES QUE APRESENTAM MALFORMAÇÕES FETAIS

Pesquisador: Sharbel Weidner Maluf

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 58143416.7.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 09/04/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.621.522

Apresentação da Notificação:

Projeto de mestrado da aluna Flora Troina Maraslis, aluna do Programa de pós-graduação em farmácia da UFSC. Será um estudo transversal que avaliará o estresse oxidativo e instabilidade genômica de sangue periférico e líquido amniótico de gestantes com malformação fetal, submetidas à punção de líquido amniótico para avaliação de cariótipo fetal, atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Amostras de sangue periférico de gestantes com gestação normal e de

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

