



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Dissertação de Doutoramento apresentada à  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
DA UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Prova de Doutoramento em Medicina,  
especialidade de Biomedicina**

**ORIENTADOR**

**Professor Doutor Jorge Branco, F.C.M-U.N.L.**

**CO-ORIENTADOR**

**Professor Kypros Nicolaidis, King's College (Londres)**



Ao meu Pai e à minha Mãe  
Ao Miguel e aos meus filhos



*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugna-la-íamos se a tivéssemos.  
O perfeito é o desumano porque o humano é imperfeito”*

*“A vida é a hesitação entre uma exclamação e uma interrogação.  
Na dúvida, há um ponto final.”*

FERNANDO PESSOA



<b>PREÂMBULO</b> .....	1
------------------------	---

## **PARTE I – DEFINIÇÃO E ÂMBITO DO ESTUDO**

### **CAPÍTULO I • DOENÇAS AUTOIMUNES**

<b>1.1 Doenças autoimunes – Definições, epidemiologia e classificação</b> .....	7
<b>1.2 Doenças autoimunes – Mecanismos fisiopatológicos multifactoriais</b> .....	9
1.2.1 Subpopulações linfocitárias T .....	10
1.2.2 Conceito Th1/Th2 .....	11
1.2.3 As células T reguladoras (Tregs) .....	12
1.2.4 “Molecular mimicry” e hipótese do hapteno .....	14
1.2.5 Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH) e Antígeno Leucocitário Humano (Human Leucocyte Antigens - HLA) .....	15
<b>1.3 Doenças autoimunes sistémicas</b> .....	18
1.3.1 Lúpus eritematoso sistémico (LES) .....	18
1.3.1.1 Classificação de LES pelo “American College of Rheumatology”	
1.3.1.2 Testes laboratoriais no LES	
1.3.2 Artrite reumatóide (AR) .....	27
1.3.3 Outras doenças autoimunes .....	30
<b>1.4 Doenças autoimunes específicas de órgão</b> .....	32
<b>1.5 A gravidez e o sistema imunitário</b> .....	33
1.5.1 Aspectos imunológicos da gravidez .....	33
1.5.1.1 Teorias sobre a imunologia da gravidez	
1.5.1.2 Estado da imunidade inata na gravidez	
1.5.1.3 Estado da imunidade adaptiva na gravidez	
1.5.2 Hormonas na gravidez .....	37
1.5.2.1 A hCG e o balanço Th1/Th2	
1.5.2.2 A hCG e as células Tregs	
1.5.2.3 A hCG e as células NK	
1.5.2.4 A hCG e os macrófagos	
1.5.2.5 O efeito da hCG na indolamina-2,3-dioxigenase (IDO)	
1.5.3 A gravidez em doentes com doenças autoimunes .....	41
1.5.3.1 O Lúpus eritematoso sistémico (LES)	
1.5.3.2 O síndrome anti-fosfolípídico (SAF)	
1.5.3.3 Artrite reumatóide (AR)	
1.5.4 O efeito da gravidez na gravidade das doenças autoimunes .....	43
1.5.5 Efeito da doença autoimune no desfecho da gravidez .....	45

## CAPÍTULO 2 · DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

<b>2.1 Fundamentos</b> .....	<b>47</b>
2.1.1 Prevalência das aneuploidias .....	48
2.1.1.1 Trisomia 21 .....	
2.1.1.2 Trisomia 18 .....	
2.1.1.3 Trisomia 13 .....	
2.1.1.4 Aneuploidias dos cromossomas sexuais .....	
2.1.2 Definições .....	51
2.1.2.1 Definições estatísticas .....	
2.1.2.1.1 Teste de rastreio; Falsos positivos e falsos negativos .....	
2.1.2.1.2 Incidência e prevalência .....	
2.1.2.1.3 Taxa de detecção .....	
2.1.2.1.4 Taxa de falsos positivos (TFP) .....	
2.1.2.1.5 Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR) .....	
2.1.2.1.6 Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo .....	
2.1.2.1.7 Sensibilidade e especificidade .....	
2.1.2.1.8 Resultados verdadeiros negativos e verdadeiros positivos .....	
2.1.2.1.9 Múltiplos da mediana (MoM's) .....	
2.1.2.2 Definições de âmbito pré-natal .....	
2.1.2.2.1 Rastreio pré-natal .....	
2.1.2.2.2 Idade gestacional .....	
2.1.2.2.3 Rastreio pré-natal pela idade materna .....	
2.1.2.2.4 Translucência da Nuca (TN) .....	
2.1.2.2.5 Rastreio combinado do primeiro trimestre .....	
2.1.2.2.6 Teste triplo .....	
2.1.2.2.7 Teste quadrúplo .....	
2.1.2.2.8 Teste sérico integrado .....	
2.1.2.2.9 Teste integrado .....	
2.1.2.3 Definição do diagnóstico pré-natal .....	
2.1.2.3.1 Biópsia das vilosidades coriónicas .....	
2.1.2.3.2 Amniocentese .....	
<b>2.2 Contexto histórico do rastreio pré-natal e diagnóstico para aneuploidias</b> .....	<b>61</b>
2.2.1 Recomendações oficiais .....	64
<b>2.3 Fundamentação do rastreio pré-natal para despiste das aneuploidias</b> .....	<b>67</b>
2.3.1 Requisitos básicos para um programa de rastreio organizado .....	68

---

<b>2.4 Rastreo pré-natal combinado do primeiro trimestre</b> .....	<b>68</b>
2.4.1 Aspectos éticos .....	69
2.4.2 A contribuição da Fetal Medicine Foundation (FMF) .....	70
2.4.3 Resultados fetais adversos .....	70
2.4.4 Parâmetros ecográficos .....	72
2.4.4.1 Comprimento crâneo-caudal (CCC)	
2.4.4.2 Translucência da nuca	
2.4.4.3 Marcadores ecográficos adicionais do primeiro trimestre	
2.4.5 Bioquímica sérica materna .....	75
2.4.5.1 Proteína A plasmática associada à gravidez (PAPP-A)	
2.4.5.2 Fracção livre da subunidade $\beta$ da hormona gonadotrófica coriónica humana ( $\beta$ -hCG livre)	
2.4.5.3 O factor de crescimento placentário (PIGF)	
2.4.6 O algoritmo para obtenção de risco .....	80
2.4.6.1 Definição de risco individual	
2.4.6.2 Os factores de correcção	
2.4.6.3 Determinação dos valores medianos	
2.4.6.4 Estimativa da taxa de detecção e de falsos positivos	
2.4.7 Modelos de rastreo do primeiro trimestre .....	87
2.4.8 Centro de referência e certificação FMF para o rastreo pré-natal .....	88
<b>2.5 Desenvolvimentos no rastreo pré-natal</b> .....	<b>89</b>

## CAPÍTULO 3 • PLACENTAÇÃO

<b>3.1 Desenvolvimento e função da placenta</b> .....	<b>93</b>
<b>3.2 A invasão do trofoblasto e o fluxo sanguíneo uteroplacentar</b> .....	<b>94</b>
<b>3.3 Produção placentar de factores de crescimento e de hormonas de regulação do crescimento</b> .....	<b>94</b>
3.3.1 Factores de crescimento Insulina-like (IGFs) .....	94
3.3.2 O papel do PAPP-A na regulação do crescimento fetal e placentar .....	95
3.3.3 O papel das hormonas na regulação do crescimento fetal e placentar .....	95
<b>3.4 Influências maternas no desenvolvimento uteroplacentar e fetal durante a gravidez</b> .....	<b>95</b>
3.4.1 O papel do LES/doenças autoimunes na regulação do desenvolvimento e crescimento fetal .....	95

## PARTE II – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

### CAPÍTULO I · FUNDAMENTAÇÃO E OBJECTIVOS DO ESTUDO

<b>1.1 Fundamentação</b> .....	<b>99</b>
<b>1.2 Objectivos Gerais</b> .....	<b>100</b>
<b>1.3 Hipótese</b> .....	<b>100</b>

### CAPÍTULO 2 · METODOLOGIA

<b>2.1. Protocolo de investigação</b> .....	<b>101</b>
2.1.1 Desenho do estudo .....	101
2.1.2 Amostra em estudo .....	101
2.1.3 Variáveis em estudo .....	102
2.1.4 Métodos de análise laboratorial .....	103
2.1.4.1 Colheita da amostra biológica	
2.1.4.2 Determinação dos parâmetros analítico	
2.1.4.3 Valores de referência em gestantes no 1º trimestre	
2.1.5 Coeficiente de variação inter-ensaio .....	108
<b>2.2 Condução do Estudo</b> .....	<b>110</b>
<b>2.3 Métodos de Análise Estatística</b> .....	<b>114</b>
<b>2.4 Aspectos Éticos</b> .....	<b>115</b>

### CAPÍTULO 3 · RESULTADOS

<b>3.1 Caracterização da Amostra do Reino Unido</b> .....	<b>117</b>
3.1.1 Avaliação dos marcadores ecográficos e bioquímicos .....	122
3.1.2 Avaliação dos indicadores de desempenho do rastreio pré-natal .....	127
<b>3.2 Caracterização da amostra Portuguesa</b> .....	<b>135</b>
3.2.1 Avaliação dos marcadores ecográficos e bioquímicos .....	137
3.2.2 Avaliação dos indicadores de desempenho do rastreio pré-natal .....	138
<b>3.3 Valores Normativos</b> .....	<b>139</b>
3.3.1 Valores normativos para as variáveis bioquímicas PAPP-A e $\beta$ -hCG livre)	
na população de gestantes portuguesas .....	139
3.3.2 Validação dos valores normativos da amostra portuguesa face à população do Reino Unido .....	140

---

**CAPÍTULO 4 · DISCUSSÃO**

<b>4.1 Avaliação do impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre</b> ....	<b>145</b>
4.1.1 Análise crítica das variáveis biofísicas, clínicas e obstétricas .....	146
4.1.2 Análise crítica das variáveis ecográficas .....	149
4.1.3 Análise crítica das variáveis bioquímicas .....	149
4.1.4 Análise crítica dos indicadores de desempenho do rastreio pré-natal .....	150
<b>4.2. Impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre – perspectiva fisiopatológica</b> .....	<b>155</b>
<b>4.3. Impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre - implicação clínica</b> .....	<b>157</b>
<b>4.4. Valores Normativos</b> .....	<b>157</b>
4.4.1. Valores normativos para as variáveis bioquímicas na população de gestantes portuguesas .....	157
4.4.2. Validação dos valores normativos da população portuguesa face à população do Reino Unido ....	158
4.4.3. Conclusão .....	160
<b>4.5. Limitações metodológicas</b> .....	<b>161</b>

**CAPÍTULO 5 · CONCLUSÕES**

<b>Conclusões</b> .....	<b>163</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>165</b>
<b>Summary</b> .....	<b>167</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>169</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>187</b>



---

## Preâmbulo

O presente trabalho representa o corolário de mais de 10 anos de dedicação a duas áreas da medicina nas quais tenho vindo a desenvolver trabalho laboratorial e de investigação clínica, a autoimunidade e o rastreio pré-natal.

O cruzamento destas áreas surgiu naturalmente na minha prática diária: como Assistente Graduada e responsável pelo Laboratório de Imunopatologia do Hospital Professor Fernando Fonseca, E.P.E., e como coordenadora da Unidade de Rastreio Pré-Natal de uma instituição particular, a trabalhar há mais de 10 anos nesta área, tive a felicidade de, empiricamente, me aperceber daquele que veio a ser o tema do trabalho de tese a que me propus.

Ao longo do meu trabalho, no terreno, no âmbito do rastreio pré-natal, enquanto Patologista Clínica, fui-me deparando com várias situações em que as grávidas tiveram de ser submetidas a processos invasivos de diagnóstico, na sequência de resultados que se vieram a revelar como falsos positivos. Perante esta evidência, fui ficando crescentemente sensibilizada para a questão da fiabilidade do processo, assim como para a determinação dos factores capazes de melhorar a sua efectividade.

Dado o meu interesse anterior na área da patologia autoimune, a minha opção acabou por cair naturalmente na eventual necessidade de introdução de factores de correcção no rastreio pré-natal das grávidas com esta patologia. Para alcançar este desiderato, comecei por fazer uma pesquisa cuidada da literatura especializada: ao contrário das minhas expectativas, deparei-me com uma quase ausência absoluta de trabalho científico nesta área.

Tendo estabelecido, anteriormente, contacto profissional com o Professor Kypros Nicolaidis, Director do “Harris Birthright Research Centre of Fetal Medicine” do King’s College Hospital (Londres, UK) e da “Fetal Medicine Foundation”, tive a oportunidade de lhe expor as minhas dúvidas e inquietações. Já na altura tinha plena consciência de que em Portugal, em virtude de vicissitudes várias, não seria fácil constituir uma casuística que permitisse chegar a algumas conclusões passíveis de se traduzirem em propostas exequíveis.

Como em qualquer outro trabalho científico, este é também resultante da convergência de várias motivações de ordem pessoal, por um lado, e de determinados contextos, por outro. No que respeita à motivações, para além de outros factores mais remotos que me trouxeram para a Patologia Clínica, e do meu gosto particular pela Imunologia, estão também factores

---

de ordem pessoal, nomeadamente a sensibilidade especial para os problemas de infertilidade das pessoas com doenças autoimunes.

A vivência de perto do risco decorrente de intervenções médicas invasivas, em doentes cujo sofrimento prolongado resultante da patologia autoimune prévia era já limitativo, fez-me interessar ainda mais no cruzamento desta duas áreas, pressentindo que este poderia ser um caminho potencialmente profícuo para investigação clínica e laboratorial.

O empenho e o interesse evidenciados pelo Professor Kypros Nicolaides, que me estimulou desde a primeira hora a tentar encontrar uma resposta à questão nuclear deste trabalho, foi absolutamente crucial para o desenvolvimento e prossecução do mesmo. A cedência do *Case Register* do King's College Hospital (Londres, UK), permitindo-me dispor de uma casuística de uma dimensão difícil de alcançar em Portugal, o apoio dos membros da sua equipe, e finalmente a aceitação para a co-orientação da tese, constituíram factores de encorajamento suplementares, que me deram uma convicção crescente de que este trabalho poderia dar frutos concretos.

Acima de tudo, para além dos conhecimentos adquiridos em todo o processo do doutoramento, fui adquirindo a convicção que caso a minha ideia se confirmasse, poderia contribuir de alguma forma para a melhoria de um processo que se reveste hoje em dia da maior importância não só clínica e laboratorial, como acima de tudo ética.

Tenho perfeitamente claro de que este trabalho não seria possível sem a colaboração de várias pessoas, a quem quero deixar o meu mais profundo agradecimento:

Ao Professor Doutor Jorge Branco, meu orientador nesta dissertação, que acreditou no meu projecto e me apoiou desde o primeiro momento, com a sua crítica construtiva. O seu papel no desenvolvimento do diagnóstico pré-natal no nosso país não pode deixar de ser aqui assinalado, tendo estimulado esta área de forma particular enquanto Director da Maternidade Alfredo da Costa.

Ao Professor Kypros Nicolaides, meu co-orientador, que permitiu e tornou possível este trabalho de dissertação. Sem o seu apoio, crítica e motivação, não teria sido viável levar a cabo este projecto. Foi uma presença constante, sempre que necessário, mesmo à distância, permitindo abrir caminhos onde eu só via escuridão. Acima de tudo, agradeço também a confiança que em mim depositou quando me facultou acesso à base de dados do King's College Hospital.

---

À investigadora Argyro Syngelaki, *Fellow* do King's College Hospital, que me apoiou na análise da base de dados.

À Dra. Rita Ribeiro, Técnica Superior Coordenadora, que me auxiliou significativamente no trabalho estatístico efectuado tanto na base de dados do King's College Hospital (Londres, UK), como na base de dados portuguesa. Para ela o meu especial agradecimento, consciente da amizade com que o fez.

À Professora Doutora Maria João Marques Gomes, pelo entusiasmo com que me apoiou, e que muito me honra.

Aos Drs. Joaquim Correia, Ana Teresa Martins, Álvaro Cohen, Jader Cruz, Isabel Martins, Amadeu Ferreira, Cláudia Appleton, assim como a tantos outros ecografistas certificados com quem tenho trabalhado diariamente nos últimos anos, agradeço a colaboração constante e a confiança em mim demonstrada.

À Dra. Margarida Albuquerque, pela generosidade e amizade com que me substituiu em várias tarefas na instituição privada em que trabalhamos.

Ao Dr. Carlos Dias, internista e coordenador do grupo de padronização em autoimunidade em que me insiro, pelo apoio científico que me deu nesta área.

A todos os meus colaboradores, tanto na instituição pública onde me insiro como na privada que dirijo. Sei que lhes pedi mais do que devia e sei também que sem o seu apoio tudo teria sido mais difícil.

À Dr.<sup>a</sup> Mónica Belchior e aos funcionários da Divisão Académica da FCM-UNL pelo profissionalismo e pela paciência com que me apoiaram.

Ao meu irmão, também meu colega, que nos últimos quatro anos me substituiu em múltiplas ocasiões, manifesto a minha gratidão, sabendo que dificilmente lhe poderei retribuir na mesma medida.

Ao meu pai, meu estímulo constante e exemplo de vida. A ele dediquei a minha vida profissional e a ele dedico também este trabalho. Agradeço-lhe as horas roubadas ao nosso projecto familiar e o apoio constante que nunca me negou.

À minha família, mãe, marido e filhos agradeço o apoio e compreensão constantes. Sem eles não teria sido capaz de levar este barco a bom porto.



PARTE I

DEFINIÇÃO E ÂMBITO DO ESTUDO



## CAPÍTULO I

# Doenças Autoimunes

## I.1 DOENÇAS AUTOIMUNES – DEFINIÇÕES, EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

As doenças autoimunes compreendem um largo espectro de doenças complexas, que surgem da interacção da susceptibilidade genética e de factores ambientais(1,2).

São doenças crónicas inflamatórias em cuja fisiopatologia e mecanismos de lesão tecidual estão envolvidos processos humorais e celulares, dependentes de factores genéticos, hormonais, psicológicos e ambientais. O aspecto essencial de uma doença autoimune é a resposta imune do próprio contra os seus próprios tecidos, com as consequentes lesões tecidulares.

Por razões ainda mal compreendidas, a incidência e prevalência dessas doenças têm vindo a aumentar em todo o mundo, afectando uma proporção significativa da população e tendo um grande impacto económico nos sistemas de saúde pública, particularmente nos países desenvolvidos.

De acordo com os dados epidemiológicos disponíveis, cerca de 5-10% população mundial industrial é afectada por uma doença autoimune, causando significativa morbilidade e mortalidade(1,3,4). Nas décadas mais recentes, a incidência têm vindo a aumentar a nível mundial, pelo que este grupo de doenças tem vindo a ser dissociado dos países ditos “desenvolvidos”(3). Estudos de revisão de literatura publicados entre 1965 e 1995 estimaram uma prevalência de 3,2% para um grupo diversificado de doenças autoimunes(5) e em 2007, um estudo epidemiológico dinamarquês, baseado em dados nacionais de hospitalização, publicou uma prevalência de 5,3%(6). Nos Estados Unidos da América atingem cerca de 5-8% de toda a população, de acordo com o comité de coordenação de doenças autoimunes do “National Institutes of Health” (NIH)(7). Este grupo de doenças representa a segunda causa de doença e a terceira causa da incapacidade, após as doenças cardiovasculares e as doenças oncológicas.

O sistema imunológico é essencial para a sobrevivência, e mesmo a mais modesta diminuição na função imune pode condicionar susceptibilidade à infecção. Mas o sistema imunológico pode também ele próprio causar doença, atacando inadequadamente as células, tecidos e órgãos do corpo. A característica comum que define as doenças autoimunes é, pois, o desapare-

cimento da tolerância imunológica e o subsequente ataque aos componentes do próprio por disfunção do sistema imunológico, mediado por auto-anticorpos e células T auto-reativas, resultando em inflamação e destruição tecidual(8).

Estão descritas mais de 100 doenças autoimunes, habitualmente divididas em doenças autoimunes específicas de órgão e doenças autoimunes sistêmicas, dependendo das principais características clínico-patológicas de cada doença(7). Nas “doenças autoimunes específicas de órgão”, em que a resposta imune é dirigida especificamente contra auto-antígenos específicos de órgão, inserem-se as doenças autoimunes endócrinas (diabetes mellitus insulino dependente (DMID), tiroidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison), as doenças autoimunes dermatológicas (pemphigus vulgaris), as doenças autoimunes neurológicas (esclerose múltipla), hepáticas (cirrose biliar primária (CBP), hepatite autoimune (HAI)), hematológicas (anemia hemolítica autoimune), entre outras(1).

A designação de “doenças autoimunes sistêmicas”, que decorre da resposta imune multi-orgânica e da distribuição sistêmica dos auto-antígenos, refere-se a um grupo de doenças que envolvem quase todos os órgãos e sistemas humanos, podendo afetar o tecido conjuntivo, o sistema nervoso, os músculos, o sistema endócrino e o sistema gastrointestinal: são exemplos a artrite reumatóide (AR), o lúpus eritematoso sistêmico (LES), o síndrome de Sjögren (SS), a esclerose sistêmica (SSc), as miopatias inflamatórias e os síndromes de sobreposição(1,2).

Apesar de sua heterogeneidade, as doenças autoimunes partilham aspectos etiopatogénicos, clínicos e epidemiológicos. Um aspecto comum à maioria dessas patologias é o seu predomínio no sexo feminino, ocorrendo frequentemente em idade reprodutiva. Com efeito, as mulheres têm um risco 2,7 vezes maior de adquirir uma doença autoimune do que os homens. Para o LES, CBP, tiroidite autoimune e SS, a relação feminino/masculino (F:M) é de 9:1, ao passo que na AR e na EM é de 3:1. Factores comuns podem justificar este predomínio: as hormonas femininas, os factores relativos à reprodução, o microquimerismo fetal, a inactivação e anomalias ligadas ao cromossoma X foram apontados(4,9).

## I.2 DOENÇAS AUTOIMUNES – MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS MULTIFACTORIAIS

Em 1901, Paul Ehrlich<sup>1</sup> concebeu a ideia original da autoimunidade, dos auto-anticorpos tóxicos e das implicações que tais auto-anticorpos representavam para a doença autoimune. Nesse modelo, um sistema imune funcional era caracterizado pelo “horror autotoxicus,” ou seja, o corpo tinha uma aversão inata à auto-destruição imunológica e usaria “certos artifícios” para evitar e prevenir o ataque imune contra o próprio, pese embora a produção de auto-anticorpos(8). No entanto, como sabemos hoje, o sistema imunológico pode, em algumas ocasiões “atacar” o próprio e originar as chamadas doenças autoimunes: para um mais aprofundado conhecimento dos distintos mecanismos fisiopatológicos das diferentes doenças autoimunes, contribuem a identificação dos componentes ambientais e do modo como interagem com factores genéticos do hospedeiro. O sistema imunológico divide-se em sistema imune inato e em sistema imune adaptativo, embora na realidade, eles sejam altamente integrados e interdependentes. O sistema imune inato é filogeneticamente mais antigo e foi desenhado para a defesa imediata dos agentes patogénicos, através de um conjunto altamente conservado de receptores de reconhecimento de padrões, tais como receptores *toll-like*, juntamente com uma pronta resposta defensiva por parte da célula. Em contraste, o sistema imune adaptativo, filogeneticamente mais recente, é composto por células T e B, que utilizam sistemas de receptores altamente diversificados e seleccionados somaticamente para o reconhecimento do antígeno (receptor de células T e imunoglobulina de superfície, respectivamente), podendo reconhecer milhões de distintos antígenos, sendo fundamentais na formação de memória imunológica(8). As células B e T auto-reactivas são um componente normal do sistema imunológico, mas não reagem contra o próprio, estando controladas por uma variedade de mecanismos, muitos dos quais parecem estar alterados por locus genéticos implicados na autoimunidade. Alguns desses mecanismos são centrais, no timo e na medula óssea, e eliminam ou desactivam clones auto-reactivos; outros são mecanismos periféricos e incluem células reguladoras especializadas, como as células T reguladoras ou Tregs(8).

Uma vez que a autoreactividade é fisiológica, o desafio está na compreensão do processo patológico pelo qual as células T e B contribuem para a lesão autoimune(1). As manifestações clínicas e o desenvolvimento do fenótipo, nas doenças autoimunes, são fortemente dependentes da marcada desregulação no sistema imune inato e adaptativo(10): se durante mui-

---

1. Importante imunologista alemão que foi Prémio Nobel de Medicina em 1908.

to tempo o sistema imune adaptativo foi considerado como responsável pelos mecanismos fisiopatológicos das doenças autoimunes, na actualidade o sistema imune inato é também considerado central na patogénese destas doenças. Novos achados identificam como fundamentais para a compreensão da autoimunidade a interacção dos componentes ambientais com os factores genéticos do hospedeiro(11).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos multifactoriais que intrinsecamente concorrem na patogénese da doença autoimune, vejamos então alguns desses componentes.

### 1.2.1 Subpopulações linfocitárias T

Os linfócitos T, com um papel fundamental na resposta imune adaptativa, podem ser caracterizados em diferentes subpopulações, dependendo das suas funções e dos seus marcadores específicos de superfície (CD-“*cluster of differentiation*”). Todas as células T expressam o receptor celular do antígeno (TCR-“*T cell receptor*”), um complexo de polipéptidos que inclui a molécula CD3, a molécula CD4 (no caso dos linfócitos T auxiliares (Th –“*T helper*”, produtores de citocinas) e a molécula CD8 (no caso dos linfócitos T citotóxicos (Tc).

O fenótipo das subpopulações de células T é definido pelo padrão de citocinas secretadas: os Th1 secretam predominantemente citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, activam outros linfócitos T e macrófagos; os linfócitos Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias (Gm-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e activam linfócitos B, levando à produção de anticorpos (Quadro 1.). Outra importante subpopulação de linfócitos T são as células T reguladoras (Tregs), com actividade imunossupressora potente, desempenhando um papel crucial no controle da tolerância imunológica. As células Tregs são identificadas como CD4+CD25+FoxP3+, e secretam duas citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 e a TGF- $\beta$ . A molécula CD25 (receptor de IL-2) é um dos principais marcadores das células Treg; a molécula FoxP3 é um factor de transcrição nuclear, crítico para a diferenciação das Tregs(12,13), também associado ao fenótipo das células Treg, que se liga à região promotora do gene de IL-2, reprimindo-o e, consequentemente, diminuindo a produção de IL-2 pelas células Th1.

Existem vários subgrupos distintos de Tregs: nas células T reguladoras CD4+, mas também na subpopulação CD8+, e também nas células T-NK são identificadas células Tregs. De modo geral, existem duas fontes principais de células Tregs: um grupo origina-se no timo, o outro, sob certas condições, desenvolve-se na periferia(10).

No que diz respeito às suas funções, as células T desempenham um papel central na regulação das funções imunes (celular e humoral). As células Th1 (imunidade celular) são importantes na defesa contra infecções virais e outras infecções intracelulares, na actividade anti-tumoral e na estimulação da hipersensibilidade tardia. Por seu turno, as células Th2 (imunidade humoral) são imprescindíveis na produção de anticorpos para a defesa contra infecções bacterianas e parasitárias, tendo igualmente um papel fundamental na manutenção de uma gravidez bem sucedida. A sobreactivação de uma das vias sustenta a hipótese, surgida em 1986, de que o desequilíbrio entre a actividade de Th1 e Th2 poderá causar doença, com as células Th1 e Th2 dirigindo diferentes vias de respostas imune(14).

**Quadro 1. Diferentes citoquinas do Sistema Imune Inato e Adquirido**

CITOQUINAS			
Imunidade Inata		Imunidade Adquirida	
Citoquinas Pro-inflamatórias	Interferons tipo 1	Th1	Th2
TNF- $\alpha$	INF- $\alpha$	IL-2	IL-3
IL-1	INF- $\beta$	IL-3	IL-4
IL-6	IL-12	IFN- $\gamma$	IL-5
		TNF- $\alpha$	IL-6
		TNF- $\beta$	IL-9
		GM-CSF	IL-10
			IL-13
			TNF- $\alpha$
			GM-CSF

### 1.2.2 Conceito Th1/Th2

O desenvolvimento do denominado “conceito Th1/Th2”, iniciado há mais de duas décadas, foi considerado o primeiro grande avanço na compreensão da importância do papel do sistema imune adaptativo no contexto da fisiopatologia das doenças autoimunes. Originalmente, o “conceito Th1/Th2” assentava na ideia de que a desregulação no sistema imune seria o resultado do desequilíbrio entre estas duas subpopulações distintas. No entanto, este não parece ser o caso em todas as circunstâncias: as citoquinas não são libertadas de modo exclusivo por uma ou por outra subpopulação(10), existindo diferenças de género na autoimunidade que importa caracterizar.

Em ambos os sexos os ambientes imunológicos são distintos e são estabelecidos pelas citocinas libertadas pelas células do sistema imune, particularmente os linfócitos T helper (Th), que parecem suportar as diferenças de género já referidas. As hormonas sexuais podem afectar o sistema imunológico de diferentes formas(10): os androgénios parecem ser supressores das respostas imunológicas celulares e humorais, sendo reconhecido que o sexo feminino tem um sistema imunológico mais robusto, com uma resposta imune humoral e celular mais forte, caracterizando-se as respostas imunes específicas das mulheres não grávidas por níveis mais elevados de respostas Th1(15).

Outro avanço importante neste campo foi a evidência de que as respostas das células T estão desequilibradas em muitas doenças inflamatórias crónicas (um perfil de resposta Th1 aumentado é identificada em muitas doenças autoimunes específicas de órgão), mas muitas doenças que previamente foram classificadas como de domínio Th1 ou Th2, não cumprem esse critério(14). Isso levanta uma questão: quais são os mecanismos de controle que impedem ou inibem o desequilíbrio Th1/Th2? Para esclarecer esta questão, é fundamental aprofundar o conhecimento as “células T reguladoras” (Tregs).

### **1.2.3 As células T reguladoras (Tregs)**

As células Tregs CD4+CD25+FoxP3+ são um subconjunto de linfócitos T com actividade immunosupressora potente que têm um papel essencial no controlo da tolerância imunológica. As células T reguladoras (Tregs), cuja diferenciação e função são controladas pelo factor da transcrição Foxp3, codificado no cromossoma X, são geradas no timo (nTregs) e induzidas periféricamente (iTregs). A sua deficiência está associada ao aparecimento de situações de auto-imunidade (20).

O desenvolvimento de subconjuntos de células T pro e anti-inflamatórias está dependente do sistema imune inato, no qual as células dendríticas, enquanto mediadoras essenciais na tolerância imunológica(16), desempenham um papel decisivo quer na apresentação de antígenos às células-T “naive”, quer na activação das células T. Quando as células dendríticas imaturas apresentam antígenos, as células T potencialmente auto-reactivas são excluídas e a sua função é suprimida, de modo a evitar reacções autoimunes.

O conceito de supressão clonal do sistema imunológico de células auto-reactivas foi uma previsão central da teoria da selecção clonal de Burnet(12). Este mecanismo, designado de tolerância central, inicia-se no timo, e constitui um importante mecanismo para o desen-

volvimento de tolerância clínica. A tolerância central no timo é, em grande parte, mediada por células epiteliais corticais, medulares e por células dendríticas tímicas, envolvendo a eliminação de tímócitos reactivos juntamente com a indução de células T reguladoras (Tregs). Estas últimas desempenham um papel fundamental na manutenção da tolerância ao “self”, suprimindo uma variedade de respostas imunes patológicas, controlando e prevenindo o desenvolvimento das doenças inflamatórias crónicas, precisamente pelo papel importante que desempenham no desenvolvimento da “tolerância clínica”.

O mecanismo do desenvolvimento da “tolerância clínica” é um mecanismo imune activo, estritamente dependente das células T e que exige o contacto prolongado com os antigénios: iniciando-se antes do nascimento, com a passagem de antigénios para o sistema imunológico fetal através da barreira placentária, continua ao longo da vida. No entanto, este processo de exclusão central pode não ser completo, permitindo assim a fuga de algumas células T auto-reactivas para o sistema imune periférico, o que torna necessária a supressão da sua função de modo a prevenir futuras reacções autoimunes(17). No sistema imune periférico a tolerância periférica é também mediada pelas células dendríticas, através da produção de Tregs e exclusão clonal das células T autoreactivas. Pensa-se que os Tregs produzidos na periferia sejam importantes para controlar a resposta imune aos antigénios do não“self”.

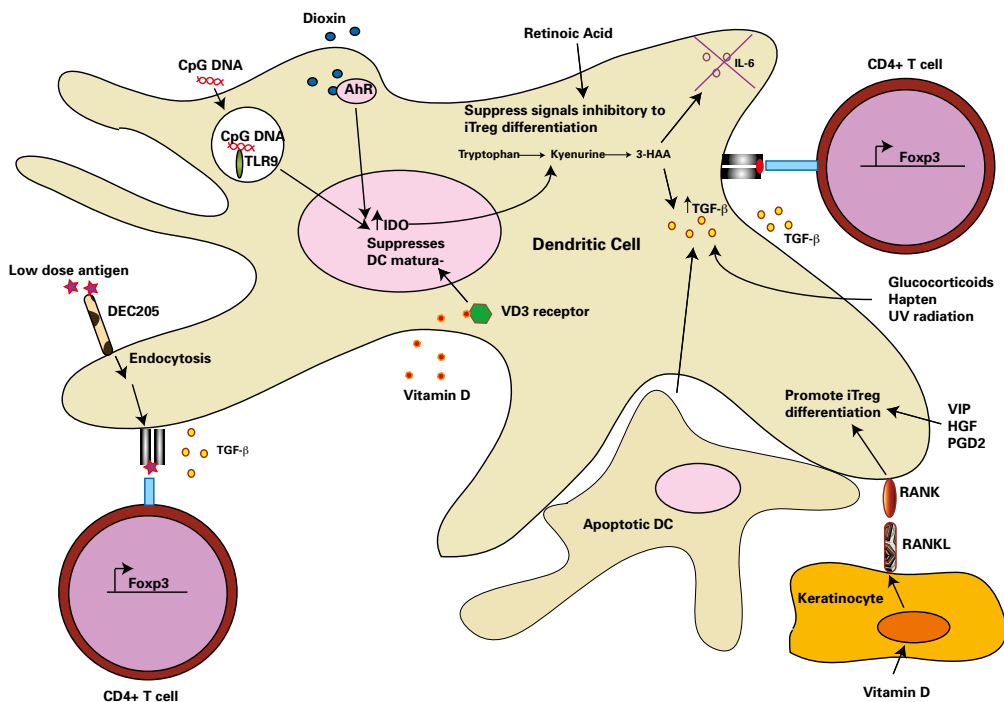
A população de Foxp3+ Tregs podem ser subdivididas em dois grupos: i. as Foxp3+Treg naturais (nTregs)(CD4+ CD25+), geralmente encontrados no timo, que expressam o factor de transcrição Foxp3+(18) e, ii. a população de Tregs induzidas (iTregs), que são derivadas dos percursoros CD4+CD25- nos tecidos periféricos, depois da activação pelo TGF- $\beta$ (19). A indução da produção deste subtipo de Tregs pelas células dendríticas é mediada pelos compostos IL-27, TGF- $\beta$ , IL-10, ácido retinóico, indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e vitamina D(20).

As células iTregs têm um papel central na manutenção da homeostase imunológica, na tolerância imunológica, na prevenção da autoimunidade e no controlo da inflamação crónica grave(20,21). Para além disso, as iTregs também agem como barreiras, induzindo o afastamento tanto de microorganismos como de células tumorais(22).

Defeitos na manutenção ou na função das Tregs estão associados ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes humanas, incluindo o lúpus eritematoso sistémico (LES)(10,23). Sabe-se hoje, que existe uma clara associação entre a doença autoimune e defeitos em genes envolvidos na tolerância periférica, pelo que, alterações genéticas ou em aspectos ambientais que afectem as células Tregs, parecem predispor à ocorrência e incidência de exacerbações da doença autoimune (11,23).

As células dendríticas surgem como essenciais em todos os processos: como células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells* - APC) iniciadoras de respostas imunes e como indutoras de tolerância das células T (29). A figura 1 fornece uma visão geral das vias envolvidas na diferenciação de iTregs mediada por células dendríticas.

**Figura 1.** As células dendríticas promovem a diferenciação das células iTregs FOXP3+ (Adaptado de (20))



### 1.2.4 “Molecular mimicry” e hipótese do hapteno

Da activação das células T por células dendríticas maduras pode resultar a manutenção da imunidade funcional ou o aparecimento de autoimunidade. Estas duas possibilidades vão depender da “intensidade” da reactividade cruzada do antígeno apresentado com o “self”: se o antígeno apresentado não tem reacção cruzada com o “self”, a activação de células T resulta em imunidade e essas células T, em seguida, podem evoluir para células T efectoras (Th1 ou Th2); se o antígeno apresentado tem reactividade cruzada com proteínas do “self”, então o resultado será a ocorrência de autoimunidade. Do mesmo modo, dependendo do grau da

reactividade cruzada, estas respostas autoimunes serão transitórias ou mantidas. Que tipo de antígenos apresentam reactividade cruzada potencial com o “self”? Foram desenvolvidos dois conceitos de forma independente. Por um lado, o mimetismo molecular (“*molecular mimicry*”), que tem por base a reacção cruzada entre antígenos ambientais e os antígenos do “self”(24), como acontece nas doenças infecciosas. Por outro, a “hipótese do hapteno”, que propõe que certos produtos químicos e ou microbianos possam reagir com componentes “self” para gerar moléculas antigénicas “*de novo*”(25). A “hipótese do hapteno” pode ocorrer quando uma célula dendrítica imatura reconhece padrões microbianos através de seus receptores “*toll-like receptors*” (TLR): quando esta célula dendrítica apresenta um péptido “*self*”, a activação das células T não ocorre; por outro lado, se a célula dendrítica imatura recebe sinais adicionais de activação através de receptores *toll-like* (componentes microbianos ou virais), uma activação indesejada da célula T auto-reactiva pode ocorrer. Este conceito pode explicar como a autoagressão pode ser induzida, na presença de antígenos microbianos, hormonais, drogas, factores ambientais, etc.

### 1.2.5 Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH) e Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigens* (HLA))

A abordagem investigacional (*genomewide association study*) usada na pesquisa genética para procurar associações entre centenas de milhares de variações genéticas específicas (eg, “*single-nucleotide polymorphisms*” ou snip’s) e doenças particulares, permitiram um novo olhar sobre a genética das doenças complexas, tais como doenças autoimunes: em mais de 200 locus genéticos foi encontrada associação a uma ou mais doenças autoimunes.

Os genes do complexo major de histocompatibilidade (CMH), que é um *locus* de controle das respostas imunes que codifica para os antígenos leucocitários humano (HLA), têm, de longe, o maior efeito genético isolado. Neste contexto, as novas descobertas genéticas em autoimunidade devem sempre ser consideradas no contexto das contribuições do CMH para a susceptibilidade a doenças e sua patogénese(8). A região do CMH no cromossoma 6 tem a mais forte associação com doenças imuno-mediadas. A região HLA, no cromossoma 6p21 pode ser dividida em três diferentes partes: classe I, classe II e classe III. A região da classe I codifica as moléculas HLA-A, HLA-B e HLA-C que são expressos na superfície celular de células nucleadas envolvidas na apresentação de antígenos endógenos às células T citotóxicas (Tc) CD8+. A região da classe II codifica muitas proteínas de membrana expressas na superfície celular de linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T activados, e que estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos exógenos às células T-helper (Th)

CD4+. A região da classe III está localizada entre as regiões das classe I e classe II e contém genes que codificam os componentes da região de complemento (C2 e C4), a proteína de choque do calor (HSP70) e os factores de necrose tumoral (TNF)(10).

A região da classe II do HLA contribui para a maioria das doenças autoimunes. Os mecanismos subjacentes permanecem desconhecidos, mas parecem ser diferentes para cada doença. Na diabetes mellitus insulino-dependente (DMID) cerca de 34% do “cluster” familiar é devido a região da classe II do CMH. Os alelos HLA associados à susceptibilidade à diabetes incluem os alelos HLA-DR3 e HLA-DR4, enquanto outros são associados com a proteção da doença, como o HLA-DR2. Por outro lado, HLA-DR2 parece predispor à esclerose múltipla (EM). A natureza protectora do HLA-DR2 na DMID e a natureza predisponente para a EM parecem justificar o limitado nº de doentes do mesmo “cluster” que apresentam ambas as doenças.

Os genes HLA-DR (nos caucasianos, o haplótipo HLA-DR15) e HLA-DQ são os genes específicos com maior risco associação à EM. O fenótipo HLA-DR4 é considerado o determinante genético comumente associado com artrite reumatóide (AR). Os alelos HLA-DR4 de maior susceptibilidade associados com AR são o alelos DRB1 \* 0401 e DRB1 \* 0404. Os caucasianos com alelos DRB1 \* 0401/0404 apresentam maior risco de uma forma mais grave de AR. O alelo HLA-DR3 parece ser um haplótipo autoimune geral não só associado à DMID, mas também ao LES, à doença de Graves, ao hipotireoidismo autoimune e à doença de Addison.

Entre todos os imunogenes que foram avaliados nas doenças hepáticas autoimunes, as mais fortes associações com doenças foram encontradas nos genes do CMH HLA classe II DR e DQ. A região HLA classe III contém muitos genes que codificam proteínas que, apesar de não estarem relacionados com a imunidade mediada por células, modulam ou regulam as respostas imunes de alguma forma, como através do factor de necrose tumoral (TNF), das proteínas de choque ao calor e proteínas do complemento (C2, C4). Os genes das proteínas do complemento C2 e C4 mostraram estar associadas com o LES, numa incidência de 75% para o C4, nos indivíduos homocigotos, e de 33% para o C2, nos indivíduos homocigotos que desenvolvem LES.

A susceptibilidade genética para o desenvolvimento da doença autoimune é um processo complexo, com muitos genes diferentes e os respectivos produtos, interagindo uns com os outros e interagindo com estímulos externos. Certas regiões do gene, especialmente HLA, causam susceptibilidade a mais de uma doença autoimune e podem explicar a co-ocorrência de algumas doenças dentro da mesma família e indivíduos(10).

Existem diferentes contribuições e interações entre factores genéticos e ambientais nas várias doenças autoimunes. A importância dos mecanismos epigenéticos na patogénese de doenças auto-imunes(26) está a receber atenção sem precedentes, tendo sido colocado em evidência pela observação dos agentes demetilantes do DNA, como na autoimunidade induzida por drogas(27). A epigenética (definida por Brooks et al, como a mudança na expressão do gene, que se mantém estável e hereditária, mas que não envolve alterações na sequência do DNA) concentra-se no estudo dos mecanismos que modificam a expressão génica, a actividade e função da célula e que são influenciados por estímulos externos, ligando o ambiente à função do gene. Existem duas principais modificações epigenéticas: metilação do DNA e as modificações das histonas(2). As alterações epigenéticas, ao contrário das genéticas que são permanentes e afectam todas as células da respectiva linha celular, são reversíveis e específicas de um tipo de célula: no LES, as células T CD4+, as células Tregs e as células B; na AR, os linfócitos e os fibroblastos da sinovial; na SSc, os linfócitos e os fibloblastos cutâneos. Mas as ocorrências epigenéticas não se limitam às doenças sistémicas, ocorrendo também na DMID, na EM e na doença celíaca(26). Os factores ambientais desempenham um papel central no aparecimento e progressão da doenças autoimunes(28). Uma variedade de factores ambientais, incluindo a exposição ao fumo do tabaco, os poluentes, os agentes infecciosos, a infecção viral, as hormonas, certas drogas, a radiação, a luz ultravioleta (UV) e alguns compostos químicos (eg. pó de sílica), entre outras condições externas, estão significativamente associados com o desenvolvimento de doenças auto-imunes(8). A maioria desses factores ambientais podem, directamente ou indirectamente, induzir alterações epigenéticas, que modulam a expressão do gene e desse modo condicionam a alterações na função imunológica da célula. Por esta razão a epigenética pode explicar, pelo menos em parte, os efeitos ambientais sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes (2).

A susceptibilidade genética tem um papel importante no desenvolvimento de autoimunidade. Nos *locus* de susceptibilidade, como já referido, mais de 200 polimorfismos contribuem para as doenças autoimunes e muitas deles são comuns a várias doenças autoimunes(8). A maioria dos *locus* de susceptibilidade afectados por polimorfismos pertencem a um de três grupos principais: 1) sistema imune inato (genes envolvidos em receptores de reconhecimento padrão como os receptores toll-like ou receptores NOD (domínio de oligomerização de ligação de nucleótidos), 2) citocinas de sinalização (citocinas de sinalização moduladas por complexos mecanismos e associações genéticas) e 3) activação de linfócitos (genes envolvidos na sinalização imune relativos aos receptores de células T e células B)(2,8). Ainda assim, os polimorfismos genéticos só representam 20% da variância fenotípica(29), não podendo explicar totalmente os padrões hereditários de doenças autoimune(2).

## I.3 DOENÇAS AUTOIMUNES SISTÉMICAS

### **1.3.1 Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)**

O LES é uma doença autoimune multisistémica que atinge desproporcionadamente o sexo feminino, especialmente na idade reprodutiva, estando associada a considerável morbidade durante a gravidez — perda fetal, parto prematuro, restrição de crescimento fetal e pré-eclâmpsia. É o paradigma de uma doença autoimune sistémica com largo espectro de manifestações clínicas. Com um pico de incidência entre os 15 e os 40 anos e com uma relação feminino:masculino de 6–10:1(30). A idade de início da doença pode variar desde a infância até à idade adulta, sendo que 20% dos casos ocorrem geralmente após a puberdade, durante as primeiras 2 décadas de vida(31). No sexo masculino, o LES não tem um pico de incidência, atenuando-se a diferença na relação feminino/masculino nos adultos com mais idade(32).

Nos EUA, a incidência média do LES foi estimada entre 1,8 e 7,6 casos por 100.000 habitantes/ano. As taxas de incidência na Europa variam de 3,3 para 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano. A incidência do LES é superior nos Afro-Americanos quando comparados com os caucasianos. Existe uma maior prevalência do LES nos familiares de 1º grau, a qual pode atingir os 25-50% nos gémeos monozigóticos. A prevalência reportada em estudos realizados nos Estados Unidos é cerca de 52 casos por 100.000 habitantes, sendo semelhante em outros países ocidentais industrializados<sup>2</sup>. A prevalência de LES parece variar de acordo com a etnia, no entanto, diferentes taxas de prevalência podem ocorrer entre pessoas da mesma etnia em diferentes localizações geográficas. O contraste entre a baixa prevalência de LES em África e a elevada prevalência entre a mulheres de etnia negra no Reino Unido, sublinha a importância dos factores ambientais(33): no geral, as mulheres de etnia negra têm uma maior prevalência de LES do que qualquer outra etnia, seguida da asiática e por fim da caucasiana. Nos Estados Unidos, as mulheres de etnia negra são 4 vezes mais susceptíveis ao LES do que mulheres de etnia caucasiana(34,35).

Clinicamente, o lúpus eritematoso sistémico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crónica, multi-orgânica, complexa, com diversas apresentações, de curso variável (de recaídas e remissões) e prognóstico variável, podendo ocorrer como uma doença fulminante e rapida-

---

2. Em Portugal a prevalência, estudada por Vasconcelos (*Epidemiologia clínica do lúpus eritematoso sistémico do norte de Portugal*, 2007), é sobreponível, ocorrendo em cerca de 40 casos em cada 100.000 habitantes.

mente fatal. É uma doença muito grave, com elevada mortalidade e morbidade: os doentes exigem cuidados multidisciplinares, são muitas vezes internados e as lesões orgânicas, resultantes da doença ou da terapêutica, podem causar deficiência considerável.

Anatomo-patologicamente, é caracterizada por uma inflamação microvascular multissistêmica com a produção de anticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos. O LES pode afectar qualquer órgão ou sistema, mas atinge principalmente a pele, as articulações, os rins, o sistema cardiovascular, o sistema pulmonar, o sistema hematológico e o sistema nervoso, resultando numa grande variedade de sinais e sintomas e numa plêiade de manifestações clínicas.

Os doentes com LES apresentam sintomas constitucionais inespecíficos de fadiga, perda de peso e febre. As manifestações músculo-esqueléticas podem incluir a poliartrite e a miosite inflamatória. Os sintomas mucocutâneos incluem as ulcerações orais e/ou nasais recorrentes, a alopecia, o fenómeno de Raynaud, as erupções cutâneas fotossensíveis, o lúpus discóide, o *rash* malar e a erupção cutânea subaguda que ocorrem com frequência. As manifestações cardiopulmonares mais comuns incluem a fibrose pulmonar e derrame pleural ou pericárdico. Manifestações cardiopulmonares menos comuns incluem miocardite, endocardite de Libman-Sacks e arterite coronária. As manifestações hematológicas incluem anemia hemolítica (Coombs positivo), leucopénia, linfopénia e trombocitopénia. O envolvimento de órgãos, tais como o rim (nefrite lúpica) ou o sistema nervoso central (acidente vascular cerebral, convulsões, coma) piora o prognóstico global. As manifestações circulatórias (trombose arterial ou venosa) podem ocorrer como consequência de síndrome antifosfolipídico secundário (SAF 2<sup>a</sup>), com anticorpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico, que promovem trombose intravascular das artérias e veias(36).

A etiopatogenia do LES não é ainda totalmente conhecida: múltiplos factores, que incluem predisposições genéticas, factores hormonais, raciais e interacções gene-ambiente, parecem estar envolvidos no processo patológico(37,38). Na fisiopatologia do LES estão envolvidos distúrbios imunes, inatos e adquiridos, envolvendo as células B, células T e células dendríticas. A presença periférica de baixas concentrações de células Tregs é factor predisponente para o desenvolvimento do LES(39), para além de que estas podem ser funcionalmente defeituosas(39-41).

A predisposição genética é suportada nos 25-50% de concordância entre gémeos monozigóticos: as discordâncias fenotípicas entre gémeos monozigóticos são uma prova clara da relação entre determinantes genéticos e factores ambientais.

Entre os diferentes factores ambientais que podem desencadear a doença encontram-se as infecções virais, a resposta a infecções bacterianas, antibióticos e outras drogas, a exposição à luz ultravioleta, o stress extremo e as hormonas. Os factores hormonais podem eventualmente explicar a maior prevalência do LES no sexo feminino. Do mesmo modo, o aumento dos sintomas no decurso da gravidez sugere a influência que as hormonas, principalmente os estrógenos, possam ter na progressão do LES. No entanto, a verdadeira razão para este desequilíbrio entre géneros, permanece ainda desconhecida.

A grande maioria dos doentes com LES são mulheres em idade fértil, e a utilização de tratamentos hormonais exógenos têm sido associados ao aparecimento de lúpus e de *flares*, voltando a sublinhar o seu papel na etiopatogénese da doença(42). O risco do desenvolvimento do LES no sexo masculino é semelhante ao das mulheres na pós-menopausa ou pré-púberes: curiosamente, o LES é mais comum em homens com síndrome de Klinefelter (i.e., genótipo XXY) do que na restante população masculina.

O lúpus caracteriza-se pela produção de anticorpos e por um sistema imune disfuncional que resulta em lesão de órgãos-alvo. Dado poder apresentar um espectro variado de sinais e sintomas, que muitas vezes são inespecíficos, o diagnóstico definitivo deve ser baseado na constelação adequada de achados clínicos e laboratoriais: os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) resumem as características necessárias para o diagnóstico (4 dos 11 critérios do ACR - Quadro 1.). Os anticorpos anti-nucleares (ANA) no soro são encontrados em quase todos os indivíduos com LES activo - anticorpos anti-DNA nativo de cadeia dupla (dsDNA) são relativamente específicos para o diagnóstico de LES.

O manejo da doença depende da gravidade da doença e do envolvimento dos órgão-alvo. O acompanhamento clínico periódico e os testes laboratoriais são imperativos para antecipar os sinais e sintomas do envolvimento *de novo* de órgãos e sistemas e monitorizar a resposta ou reacções adversas às terapias.

### **1.3.1.1 Classificação do LES pelo “American College of Rheumatology”**

Os critérios revistos de 1997 para a classificação do lúpus eritematoso sistémico, são baseados no conjunto de critérios estabelecidos em 1971 (e revistos em 1982) por um grupo de clínicos da anterior Associação Americana de Reumatologia, actual Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology (ACR)). Estes critérios, com base em metodologia estatística e doentes reais, têm uma sensibilidade de 78 a 96% e uma especificidade do 89 a 100%(43) (Quadro 2.)

**Quadro 2. Critérios de classificação para o diagnóstico de LES:**

Diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico requer a presença de 4 ou mais dos 11 critérios, de modo seriado ou simultaneamente, durante qualquer período de observação. (American College of Rheumatology 1982 revistos em 1997)(44,45).

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
<b>1. Rash Malar</b>	Eritema fixo, achatado ou elevado, sobre a região malar, poupando as pregas nasolabiais.
<b>2. Rash Discoide</b>	Manchas eritematosas elevadas com escalas queratósicas; cicatrizes atróficas em lesões antigas.
<b>3. Fotosensibilidade</b>	Rash cutâneo como resultado de reação pouco usual à luz ultra-violeta.
<b>4. Ulceras Orais</b>	Ulceração oral ou nasofaríngea.
<b>5. Artrite não erosiva</b>	Artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor, edema ou derrame.
<b>6. Serosite</b>	Pleurite evidente na história clínica ou evidência de derrame pleural <i>ou</i> Pericardite documentada por electrocardiograma ou por evidência de derrame pericárdico
<b>7. Disfunção Renal</b>	Proteinúria persistente >0,5 gr/dia ou >3+ na urina tipo II <i>ou</i> Cilindros celulares (cilindros hemáticos, células granulares, tubulares ou mistos)
<b>8. Disfunção Neurológica</b>	Convulsões, na ausência de drogas ou disfunções metabólicas (urémia, cetoacidose ou desequilíbrio hidroelectrolítico) <i>ou</i> Psicose, na ausência de drogas ou disfunções metabólicas (urémia, cetoacidose ou desequilíbrio hidroelectrolítico)
<b>9. Disfunção Hematológica</b>	Anemia hemolítica com reticulocitose <i>ou</i> Leucopénia (<4.000/mm <sup>3</sup> em ≥ 2 ocasiões) <i>ou</i> Linfopénia (< 1,500/ mm <sup>3</sup> em ≥ 2 ocasiões) <i>ou</i> Trombocitopénia (<100,000/ mm <sup>3</sup> ) na ausência de consumo de drogas
<b>10. Disfunção Imunológica</b>	Anti-dsDNA: anticorpo anti-DNA num título elevado <i>ou</i> Anti-Sm: presença de anticorpos antígeno nuclear anti-Sm <i>ou</i> Achados de resultados positivos de anticorpos anti-fosfolípidos: · ACA (IgG ou IgM) · Resultado positivo do teste anticoagulante lúpico (LA) · Resultado falso-positivo do teste VDRL (durante pelo menos 6 meses) confirmado por FTABs ou RPR (testes treponémicos)
<b>11. Anticorpos Anti-nucleares (ANA)</b>	Título anormal de ANA por IIF (na ausência de consumo de drogas)

*Adaptado de Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982;25:1274, and Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [Letter]. Arthritis Rheum 1997;40:1725.*

### 1.3.1.2 Testes laboratoriais no LES

O teste de rastreio mais utilizado e que constitui o “gold standard” do diagnóstico do LES, é a pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA<sup>3</sup>) por imunofluorescência indirecta (indirect immunofluorescence - IIF) no tecido epitelial humano de (HEp2). O IIF é um teste de rastreio eficaz (sensibilidade > 95%) e adequado em doentes com características clínicas sugestivas de LES, permitindo detectar a maioria dos anti-dsDNA, antigénios nucleares extraíveis (ENA) e outros auto-anticorpos. As células HEp-2 são o substrato mais sensível para a detecção de ANA, pelo que a sua valorização deve sempre ter em conta a probabilidade pré-teste por forma a aumentar o valor preditivo positivo (VPP) do teste e diminuir os falsos positivos. A presença destes autoanticorpos, em títulos baixos, não é específica resultando em baixo VPP do teste ANA para o diagnóstico de LES(46)(Quadro 3.), embora, mais de 99% dos doentes com LES tenha títulos elevados de ANA(36).

**Quadro 3. Prevalência de resultados falsos positivos para um ponto de corte de 1/160**

Doença	Prevalência do ANA
População saudável	< 5%
Idoso (> 65 anos)	< 30%
Gravidez	5-10%
Doenças neoplásicas	10-30%
Infecções crónicas	10-50%
Febre reumática	< 5%

*Adaptado de: “Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens”. American College of Pathologists; A Kavanaugh, R Tomar, J Reveille, D H Solomon, and H A Homburger; University of Texas Southwest. Medical School, Dallas, USA; Arch Pathol Lab Med—Vol 124, January 2000*

3. Qualquer anticorpo contra qualquer componente celular é considerado um anticorpo anti-nuclear (ANA). O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune onde auto-anticorpos são frequentemente dirigidos contra antigénios intracelulares do núcleo celular (DNA de dupla cadeia (dsDNA), histonas) e contra antigénios nucleares extraíveis (ENA) e/ou citoplasma).

As taxas de positividade do teste ANA são afectadas pela prevalência do LES na população, especificamente no que se refere à taxa de falsos positivos, que será mais elevada quanto mais baixa for a prevalência na população estudada, como na população dos cuidados primários de saúde. Após um resultado positivo para ANA, devem ser executados testes mais específicos para determinar os autoantígenos específicos aos quais os ANA reagem, de modo a confirmar ou não o diagnóstico de LES. Uma combinação de ENA (SSA-Ro, SSB-La, Sm, RNP) e testes de dsDNA irão detectar a maioria dos doentes com LES(46-48).

Na ausência do diagnóstico de LES, outras possíveis razões para um resultado verdadeiro positivo no teste ANA serão a presença do síndrome de Sjögren (68%), esclerodermia sistémica (40 a 75%), artrite reumatóide (25 a 50%), e artrite reumatóide juvenil (20%), a DMTC ( $\approx 100\%$ ) (Quadro 4.). O “American College of Rheumatology” recomenda a execução dos testes ANA em doentes com dois ou mais sintomas ou sinais referidos no quadro 2. Na maioria das circunstâncias, um título de ANA persistentemente negativo, num contexto clínico sugestivo, pode permitir a exclusão do diagnóstico de SLE(43,49).

**Quadro 4. Prevalência dos ANA nas doenças autoimunes**

<b>Doenças autoimunes</b>		<b>Prevalência do ANA</b>
<b>Doenças em que o ANA é muito útil para o diagnóstico</b>		
Lúpus Eritematoso Sistémico	Activo	95-100%
	Inactivo	80-100%
Síndrome do Lúpus Neonatal		< 90%
Esclerose Sistémica ou Esclerodermia		60-80%
Cirrose Biliar Primária		95-100%
<b>Doenças em que o ANA é moderadamente útil para o diagnóstico</b>		
Síndrome de Sjörgen		40-70%
Poliomiosite e Dermatomiosite		30-80%
<b>Doenças em que o ANA é útil para a monitorização ou prognóstico</b>		
Artrite Juvenil Crónica com Uveítis		20-50%
Fenómeno de Raynaud		20-60%
<b>Condições em o ANA é critério diagnóstico</b>		
Lúpus Eritematoso Medicamentoso		≈100%
Hepatite Autoimune		≈100%
Doenças Mista Tecido Conjuntivo		≈100%
<b>Doenças para as quais o ANA não é útil para o diagnóstico</b>		
Artrite Reumatóide		30-50%
Outras doenças reumáticas		20-50%
Esclerose Múltipla		25%
Púrpura Trombocitopénica Idiopática		10-30%
Colite Ulcerosa		26%
Lúpus Discoide Crónico		5-25%
Tiroidite		30-50%

*Adaptado de: "Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens". American College of Pathologists; A Kavanaugh, R Tomar, J Reveille, D H Solomon, and H A Homburger; University of Texas Southwest. Medical School, Dallas, USA; Arch Pathol Lab Med—Vol 124, January 2000*

O anticorpo anti-dsDNA é um importante marcador da evolução e da actividade da doença, nomeadamente da nefrite lúpica (50), utilizado na monitorização da doença e na detecção de exacerbações. O anticorpo anti-Sm pode aparecer com a evolução da doença e os títulos podem também flutuar com actividade da doença e com a terapêutica, mas a monitorização seriada de anticorpo anti-Sm não prediz a recidiva(47). O anticorpo anti-dsDNA e anticorpo anti-Sm (em títulos elevados) têm uma especificidade de (95%; 99%) para LES, para uma sensibilidade baixa (40-60%; 20%)(51). Portanto, um resultado positivo ajuda a estabelecer o diagnóstico, enquanto que um resultado negativo não o exclui(49).

#### Quadro 5. Prevalência da positividade serológica no LES

Anticorpo-Alvo	Positividade (%)	Possível Associação Clínica
dsDNA	30-70	Nefrite lúpica; actividade da doença
Sm	20-40	Raramente observada sem ser no LES
RNP	40-60	DMTC; Síndrome Overlap
Ro (SSA)	10-15	Síndrome Sjörgen; envoltimentos cutâneo; Bloqueio Cardíaco Congénito
Ribossomal P0,P1,P2	5-10	Lúpus Neuropsiquiátrico; actividade da doença
Histona	50-80	Lúpus medicamentoso; Lúpus idiopático; actividade da doença
ACA	40-50	Risco de complicações trombóticas; perda fetal; Púrpura Trombótica Idiopática

*Adaptado de :”The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE”; W Egner; Department of Immunology and Protein Reference Unit, Northern General Hospital, Sheffield; J Clin Pathol; 2000 vol. 53 (6) pp. 424-432.*

Outros anticorpos passíveis de serem encontrados no LES (Quadro 5.) são os anticorpos anti-histona, os anticorpos anti-SSA (Ro), o anti-SSB (La), não sendo nenhum deles específico do LES<sup>4</sup> (podem ser encontrado noutras patologias autoimunes, tais como o SS ou outras conectivites(47)). A sua prevalência é variável, mas se bem contextualizados clinicamente podem suportar o diagnóstico de LES (49), sobretudo na ausência de anti-dsDNA.

4. A especificidade deste anticorpos aumenta se forem eliminados os resultados fracos positivos

Os anticorpos anti-RNP são muito comuns e menos específicos para o diagnóstico de LES, embora muito específicos para o diagnóstico das DMTC. Os anticorpos anti-ribosoma P (*Ribosomal P protein*) estão associados ao quadro neuropsiquiátrico do LES, mas o seu valor preditivo é incerto e controverso. Os anticorpos anti-cardiolipina (ACA) ocorrem em 40–50% dos doentes com LES, constituindo um factor de risco para a trombose e para o síndrome antifosfolipídico. Os ACA podem ser um factor de risco adicional para a gravidez no LES. Os anticorpos anti- $\beta$ 2 glicoproteína I (25% dos doentes com LES) estão mais estreitamente associados a trombose, no síndrome antifosfolipídico primário e no LES. Testes adicionais como o LA (anticoagulante lúpico) são essenciais, pois a sua presença, mesmo sem ACA, pode prever uma eventual tendência para trombose. Outros anticorpos antifosfolipídicos, como os anti-antifosfatidilserina, anti-anexina V e o anti-tromboplastina, têm um valor diagnóstico controverso(47,50).

A velocidade de sedimentação é um indicador sensível, mas não específico, da actividade no LES, enquanto que a proteína C reativa (PCR) reflecte apenas a infecção/inflamação aguda, dada a sua curta semi-vida(47). Apesar das fracções do complemento C3 e C4 poderem não sofrer alterações no LES activo, a determinação do complemento pode ser muito útil, sendo que são necessárias determinações seriadas de C4 para ser informativa: uma fracção C3 persistentemente baixa está associada a doença renal crónica. Os ensaios da via clássica (CH100/CH50) não conseguem distinguir a deficiência do consumo grave, mas podem excluir deficiências no início da via complemento (C1, C2 ou C4), que podem estar associadas ao LES. Pelo contrário, as concentrações de C3 e C4 são precisas, mesmo se só sejam úteis em alguns doentes(47,49). Os anticorpos anti-C1q são detectados em 90% dos pacientes com LES, mas também são encontrados na glomerulonefrite membranosa e na vasculite reumatóide.

As evidências laboratoriais específicas de recidivas do LES incluem: o aumento dos anticorpos anti-dsDNA, a redução de níveis do complemento (C3, C4 e CH50), o teste de Coombs positivo, a presença de glóbulos vermelhos na urina e a presença de anticorpos anti-plaquetas(52). Quando a recidiva está associada a nefrite lúpica, a definição obriga à presença dos critérios da ACR: proteinúria persistente  $>0.5$  gm/dia ou  $>$  que 3+; sedimento urinário activo com cilindros celulares ( $>5$ GV/por campo de elevada resolução;  $>5$  GB/por campo de elevada resolução a ausência de infecção; ou cilindros celulares)(53).

### 1.3.2 Artrite Reumatóide (AR)

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crónica, caracterizada por uma inflamação crónica da membrana sinovial, com edema e dor articular, podendo levar à destruição óssea e articular progressiva e resultando em graves deficiências motoras e perda de qualidade de vida, com risco acrescido de morte prematura. Devido à presença de autoanticorpos tais como o factor reumatoide (FR) e os anticorpos anti-péptido citrulinado cíclico (CCP ou ACPA), que podem preceder o quadro clínico em muitos anos, e das manifestações extra-articulares apresentadas por muitos doentes, a AR é considerada uma doença autoimune sistémica(54). O pico de início da AR ocorre depois dos 40 anos de idade, sendo mais comum no sexo feminino, numa relação de 3:1(55).

As estimativas sobre a incidência de AR nos EUA e no norte da Europa, atingem os 20 a 50 casos por 100.000 habitantes/ano, com uma prevalência de 0,5-1,1%, ao passo que no sul da Europa verificam-se menores taxas tanto de incidência (9 a 24 casos por 100.000 habitantes/ano) como de prevalência (0,3% para 0,7%)(55). Estudos de prevalência realizados em países em vias de desenvolvimento, com base nos critérios de 1987 do “American College of Rheumatology” (ACR)(56), sugerem prevalências significativamente menores do que no norte da Europa e na América do Norte, de cerca de 0,1% a 0,5 %, embora estes dados possam resultar de infradiagnóstico(55).

**Quadro 6. Comparação dos critérios de diagnóstico de 1987 e de 2010 ACR/EULAR critérios de classificação para AR.**

Criterion	Definition	Target population: Patients who (i) have at least one joint with clinical synovitis, and (ii) the synovitis not better explained by another disease	Score
<b>A patient is classified as RA if 4/7 criteria are satisfied. Criteria 1-4 must have been present for ≥6 weeks</b>		<b>Add score of categories A–D; a score of ≥6/10 needed to classify patient as having definite RA</b>	
		<b>A. Joint involvement (tender/swollen)</b>	
1. Morning stiffness	Morning stiffness in and around the joints, lasting at least an hour before maximal improvement	1 large joint	0
2. Arthritis of ≥3 joints	≥3 joints simultaneously have had synovitis observed by a physician	2-10 large joints	1
3. Arthritis of hand joints	At least 1 area swollen in a wrist, MCP or PIP joint	1-3 small joints (with or without involvement of large joints)	2
4. Symmetric arthritis	Simultaneous involvement of the same joint areas on both sides of the body	4-10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
5. Rheumatoid nodules	Subcutaneous nodules, over bony prominences, extensor surfaces or juxta-articular regions	>10 joints (at least 1 small joint)	5
6. Serum rheumatoid factor (RF)	Positive RF	<b>B. Serology</b>	
7. Radiographic changes	Radiographic changes typical of RA in posteroanterior hand and wrist radiographs	Negative RF/ACPA	0
		Low-positive RF/low-positive ACPA	2
		High-positive RF/high-positive ACPA	3
		<b>C. Acute-phase reactants</b>	
		Normal CRP/ESR	0
		Abnormal CRP/ESR	1
		<b>D. Duration of symptoms</b>	
		<6 weeks	0
		≥6 weeks	1

1987 ACR Classification criteria for RA

2010 ACR/EULAR Classification criteria for RA

(Adaptado de (54))

As preocupações relativas ao infradiagnóstico fizeram surgir o grupo de trabalho conjunto da ACR e da Liga Europeia Anti-Reumatismo (EULAR), com o intuito de desenvolver novos critérios de classificação de AR (Quadro 6.). Os anteriores critérios de 1987 tinham limitações, nomeadamente na capacidade de detectar precocemente os doentes que poderiam beneficiar de intervenções precoces, face às novas ferramentas terapêuticas, impedindo deste modo que fossem atingidos estados de doença avançados e irreversíveis, com doença crónica e erosiva(54). O ponto B dos critérios ACR/EULAR 2010, que entra em linha de conta com a serologia e com a presença dos anticorpos anti-péptido citrulinado cíclico (CCP), tem um papel importante no diagnóstico precoce: os anti-CCP pode positivar muitos anos antes das manifestações clínicas e os títulos de anticorpos correlacionam-se com a progressão da doença erosiva(57). A concomitante presença ou ausência dos CCP e do FR define dois subconjuntos importantes de pacientes: os doentes com AR e com CCP positivo constituem um grupo diferente dos doentes com CCP negativo, nomeadamente no que diz respeito ao substrato genético (HLA-DRB1 e PTPN22) e aos factores de risco ambientais (tabagismo)(57).

A artrite reumatóide é uma doença multifactorial, que resulta de interacções entre factores genéticos e factores ambientais. Os factores genéticos contribuem em 50% a 60% para o risco de desenvolver AR. Os principais factores genéticos são o locus HLA-DRB1 e o gene tirosina-fosfatase PTPN22. O gene com maior associação com a AR é o HLA-DRB1 (contribui em 1/3 para a susceptibilidade genética da AR) do complexo major de histocompatibilidade, onde os alelos específicos DRB1\*04 e \*01 codificam as sequências do “epitopo-compartilhado” expressos na molécula DRB1. Entre outros genes, o principal factor de susceptibilidade para a AR é o gene da tirosina-fosfatase PTPN22 no cromossoma 1. Dos factores ambientais implicados no desenvolvimento da AR, os hábitos tabágicos ocupam o primeiro lugar, estando também associados aos piores *outcomes*. Tal como referido, o predomínio da AR no sexo feminino sugere um eventual papel dos factores hormonais: a gravidez em doentes com AR leva frequentemente à remissão da mesma, muitas vezes seguida por uma nova crise após o parto(55).

### 1.3.3 Outras doenças autoimunes

#### Síndrome Antifosfolípídico (SAF)

O síndrome anti-fosfolípídico (SAF) é um síndrome autoimune caracterizado pela presença de anticorpos anti-fosfolípidicos no plasma de doentes com trombose venosa, arterial e/ou complicações obstétricas, tais como os abortos recorrentes e/ou perda fetal recorrente. Os anticorpos anti-fosfolípidos estão implicados na trombose intraplacentar, na lesão placentar mediada pelo complemento e na acção directa sobre as células do trofoblasto.

Outras manifestações clínicas incluem, a trombose de grandes e pequenos vasos acompanhados de isquémia e enfarte multiorgânico, doença coronária precoce, acidente vascular cerebral.

Os anticorpos antifosfolípidos são uma família complexa de anticorpos, que abrangem um largo espectro de alvos específicos e de afinidades, reconhecendo várias combinações de fosfolípidos e de proteínas ligantes aos fosfolípidos. São eles o anticoagulante lúpico (LA), os anticorpos anticardiolipina (ACA), aos anticorpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína I (uma proteína ligante dos fosfolípidos).

Cerca de 40 a 50% dos doentes com LES e, numa menor percentagem, doentes com outras patologias autoimunes reumáticas (até mesmo em pessoas saudáveis), podem apresentar estes anticorpos. O SAF é geralmente diagnosticado no âmbito de um diagnóstico prévio de lúpus, mas pode ser constituir um síndrome primário(58) (Quadro 7.).

**Quadro 7. Sumário dos Critérios de Sydney (2004).**

Critérios de classificação do síndrome antifosfolipídico

<b>Critérios de Classificação do síndrome antifosfolipídico (Sydney 2004)</b>
<b>Critérios Clínicos</b>
<p><b>Trombose Vascular</b> Um ou mais episódios clínicos documentados de trombose vascular (arterial, venosa, de pequenos vasos) em qualquer tecido ou órgão. Trombose deve estar presente sem evidência de inflamação da parede vascular.</p> <p><b>Morbilidade na Gravidez</b> a) Um ou mais episódios de morte fetal de fetos morfológicamente normais ou para além d 10ª semana gestacional. b) Um ou mais partos pré-termo de recém-nascidos morfológicamente normais, antes das 34 semanas gestacionais, por:     (i) Eclâmpsia ou preeclâmpsia grave, ou     (ii) Induficiência placentar c) 3 ou mais abortos de repetição espontâneos consecutivos e sem explicação antes das 10 semanas de gestação</p>
<b>Critérios Laboratoriais</b>
<p>Presença de anticoagulante lúpico, no plasma, em 2 ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas entre as determinações.</p> <p>Anticorpo anticardiolipina (IgG ou IgM), no soro ou no plasma, presente em título médio ou elevado (&gt;40 GPL ou MPL), em 2 ou mais ocasiões, com 12 semanas de intervalo entre as determinações.</p> <p>Anticorpo Anti-β2GPI (IgG ou IgM), no soro ou plasma, presente em título médio ou elevado, em 2 ou mais ocasiões, com 12 semanas de intervalo entre as determinações.</p>

*(Adaptado de(58))*

Podemos afirmar estarmos perante o síndrome antifosfolipídico se pelo menos um dos critérios clínicos e um dos critérios laboratoriais estiverem presentes.

**Esclerose Múltipla (EM)**

É uma doença autoimune desmielinizante, cujo órgão-alvo é o sistema nervoso central (SNC). Na etiopatogénese da EM existem componentes neurodegenerativos, com atrofia da substância cinzenta, e componentes inflamatórios, com zonas de lesão da substância branca. A relação feminino:masculino é maior nos doentes com menos de 20 anos de idade (3,2:1) quando comparados com a população total de EM (2:1)(15).

A ressonância magnética (RM) caracteriza-se por imagens de reforço que correspondem a lesões no cérebro e que se pensa serem marcadores de focos inflamatórios, correspondendo clinicamente a recaídas. Após uma recaída, a recuperação completa ou parcial das funções pode demorar semanas ou meses. Esta fase da doença é caracterizada pelo predomínio de lesões inflamatórias. Cerca de 5-15 anos após o diagnóstico, a maioria dos doentes transitam para uma forma da doença mais permanentemente debilitante, chamada fase secundária

progressiva. Os doentes nesta fase têm menos recaídas, mas as recaídas que ocorrem estão associadas a uma recuperação mais pobre, com progressão para a incapacidade, tornando-se a atrofia mais aparente na RM(15).

A EM é mediada por linfócitos T CD4+ que infiltram o SNC, secretando citocinas tipo Th1 e desencadeando uma cascata de eventos que leva à desmielização dos axónios. Por outro lado, pensa-se que as citocinas Th2 sejam eventualmente protectoras na EM(15).

#### I.4 DOENÇAS AUTOIMUNES ESPECÍFICAS DE ÓRGÃO

**Doença Inflamatória Intestinal (DII)** - esta designação inclui a doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerosa (CU), doenças inflamatórias do tracto gastrointestinal que estão desigualmente distribuídas nas populações. Embora a sua etiopatogenia permaneça desconhecida, os estudos de epidemiologia da DII fornecem algumas pistas. A DII é relativamente rara e as maiores taxas de incidência ocorrem durante os anos férteis (59). A apresentação clínica da DII é insidiosa e o intervalo de tempo entre o início e o diagnóstico da doença pode ser bastante longo, tornando-se difícil de identificar e estudar os eventos causadores. Tal como no caso do LES (como se verá adiante), às mulheres com DII era aconselhado evitarem a gravidez, pelo risco aumentado de complicações, consequência da desnutrição, inflamação, infecção e medicação(60). No entanto, as terapêuticas actuais permitem longos períodos de remissão sintomática, levando muitas mulheres a considerar a gravidez. O aconselhamento sobre o sucesso da gravidez, o próprio impacto da gravidez na DII e do tratamento nos resultados da gravidez, têm sido dificultados pela escassez de dados de base populacional. Ter uma doença inflamatória intestinal, com eventual história de cirurgia, são ambos fortes preditores de desfecho adverso da gravidez. Por outro lado, a actividade ou não da doença não parece ser um factor predictivo de mau desfecho(61).

## I.5 GRAVIDEZ E O SISTEMA IMUNITÁRIO

Neste capítulo serão abordadas individualmente algumas doenças autoimunes sistémicas e algumas doenças específicas de órgão, com o propósito de as relacionar com a gravidez.

A pertença ao sexo feminino tem sido sistematicamente apontado como um factor de susceptibilidade central para a ocorrência de doenças autoimunes (15). Durante os anos férteis existe uma distinta preponderância feminina para as doenças autoimunes: cerca de 75% das doenças autoimunes ocorrem em mulheres em idade reprodutiva e estas doenças são consideradas a 4ª causa mais importante de incapacidade para o sexo feminino(4). De facto, pertencer ao sexo feminino confere um risco maior de desenvolver patologias tais como LES, EM, CBP e AR, do que qualquer outro factor de risco individual, seja genético ou ambiental(15).

As grávidas com doenças autoimunes apresentam características peculiares a nível do sistema imunitário, hormonal e de interacção entre ambos, que podem condicionar o curso da respectiva doença autoimune, e consequentemente aumentar a probabilidade de ocorrência, numa proporção superior à da população geral, de efeitos adversos na gravidez(62).

Por esse motivo, o conhecimento sobre as principais vias fisiopatológicas da doença autoimune adquire um papel crucial no sexo feminino, particularmente durante a gravidez.

### **1.5.1 Aspectos imunológicos da gravidez**

#### 1.5.1.1 Teorias sobre a imunologia da gravidez

Do ponto de vista estritamente imunológico, a gravidez parece ser um paradoxo, isto se considerarmos o embrião e a placenta em desenvolvimento como um “semi-alografo”, inscrito no ambiente potencialmente hostil do sistema imunitário materno. A gravidez constitui um desafio para o sistema imunológico materno: se por um lado, tem de se adaptar para tolerar o alografo fetal, por outro, tem de manter um resposta imune suficientemente eficiente para proteger a mãe e o feto contra infecções. Vários estudos mostram que a gravidez é um estado de inflamação controlada (ver ponto iii)), com níveis aumentados das citocinas Th1 e Th2, mas com um “desequilíbrio” Th2(63). Tendo esta visão sido aceite até há algum tempo, o paradigma Th1/Th2 tem vindo a ser considerado ultrapassado. O sistema imunológico da gravidez, nomeadamente na interface feto-placentar, é de extrema complexidade e precisão.

Nesta secção, serão passados em revista: i) a imunossupressão materna ii) o ambiente enviesado de citocinas Th2 iii) e o estado controlado de inflamação na gravidez.

### **i) A imunossupressão materna na gravidez**

Em 1953, Medawar e colegas formularam o primeiro conceito explicativo de tolerância imunológica na gravidez, propondo três explicações possíveis para a tolerância imunológica materna: i) a separação física dos tecidos maternos e fetais; ii) a imaturidade antigénica dos tecidos fetais; iii) e a imunossupressão materna(64). A imunossupressão materna obteve mais consenso, apesar de se saber hoje que na gravidez e na interface feto-materna não se trata apenas de tolerância a um tecido estranho e não existe uma supressão geral da resposta imune, estando implicados mecanismos imunoreguladores locais (eg, citocinas), que também incluem os mecanismos de adesão e de vascularização(65-67).

Há também abundante evidência acerca da tolerância imunológica mediada por células T. As células Tregs (ver capítulo 1.2.3.) são uma subpopulação natural de células T essenciais para a tolerância imunológica e suportam a tolerância materna para com o seu feto, protegendo-o de rejeição pelo sistema imunológico materno(68). A quantidade de células de Treg no útero sugere que a supressão da resposta imune anti-fetal ocorre de forma localizada e antigénio-orientada(68). Este pool de células T reguladoras CD4+CD25+ expande-se de forma significativa durante a gravidez, regredindo posteriormente no pós-parto(69).

### **ii) O paradigma Th1/Th2 na gravidez**

Wegmann et al. foram os primeiros a propor que a sobrevivência fetal dependeria da modulação materna das respostas imunes no sentido da imunidade Th2, com a inibição das respostas Th1(70).

Suprimir transitoriamente durante a gravidez as respostas imunes pró-inflamatórias, mediadas por células do tipo Th1 e envolvidas na rejeição fetal, aparenta ser uma vantagem evolutiva para a mãe. Deste modo, na gravidez, ocorre a expressão preferencial de citocinas Th2, necessárias para evitar a rejeição fetal(15)<sup>5</sup>. Vários estudos reportam a produção aumentada de citocinas Th2 em gravidezes bem sucedidas(15). Outros estudos referem que a produção preferencial das citocinas Th1 pode resultar em placentação anómala, crescimento anormal do embrião e subsequente perda fetal(71).

Estudos referem que na gravidez normal, em comparação com o estado de não-grávido, não só os níveis de citocinas Th2 estão elevados, mas também os níveis de algumas citocinas

---

5. Este autor refere que a mudança de Th1 para Th2 ocorre tanto localmente na interface materno-fetal como sistemicamente.

Th1. Esta evidência contrasta com os níveis diminuídos de Th1 sugeridos pelo paradigma Th1/Th2(72).

O paradigma Th1/Th2 e o modelo imunotrópico, ambos de Wegmann, surgiram numa altura em que se pensava que o diálogo mãe-feto dependia em exclusivo da produção de citocinas pela mãe. Como já se referiu, o paradigma Th1/Th2 verificou-se ser uma simplificação e o conceito da gravidez enquanto fenómeno Th2 requereu reavaliação: estudos decorrentes do aprofundamento da problemática da implantação fetal, no contexto da reprodução medicamente assistida, permitiram uma revisão dos conceitos e um novo olhar sobre os seus mecanismos(73): a inflamação tem um papel importante na implantação fetal, significando que a gravidez não está, de modo algum, apenas dependente de uma resposta Th2 (ver iii)). O trofoblasto é capaz de libertar citocinas anti-inflamatórias, tais como o IL-10, tendo-se constatado que os mecanismos imunes na interface não dependem apenas dos linfócitos maternos(65). O aumento da IL-10 trofoblástica é muito eficaz na protecção dos efeitos deletérios das citocinas Th1, sendo da maior importância na protecção do feto(66).

### **iii) A gravidez como uma condição de inflamação controlada**

Mais recentemente, novos estudos sugeriram que a gravidez seria um estado controlado de inflamação, com um papel de destaque para o sistema imune inato(72). Existem duas interfaces imunológicas distintas na gravidez: localmente, na decídua, entre células do sistema imunológico materno e os trofoblastos fetais; sistemicamente, entre as células imunitárias da circulação materna e o sinciotrofoblasto que forma a superfície das vilosidades placentária. O sinciotrofoblasto liberta hormonas (eg, hCG e micropartículas celulares) para a circulação materna, interagindo dessa forma com as células do sistema imunológico materno. Numa fase inicial, a condição inflamatória, útil para a implantação e gravidez, ocorre predominantemente no local de implantação. No decorrer da gravidez esta condição estende-se para a circulação materna(72). Esta resposta inflamatória sistémica na gravidez normal caracteriza-se por leucocitose, aumento do número de células NK na decídua, aumento da estimulação dos monócitos, aumento da atividade fagocítica e produção de citocinas pró-inflamatórias. Tem sido sugerido que embora estas alterações inflamatórias possam ser tão intensas como as observadas em doentes com sepsis, surpreendentemente não parecem prejudicar a mãe e o feto(74). Esta constatação sugere que factores específicos de gravidez, como a secreção de IL-10 pelo trofoblasto, referido em ii), bem como as células Tregs já mencionadas, poderão intervir no controle da resposta inflamatória(63).

### 1.5.1.2 Estado da imunidade inata na gravidez

As células efectoras primárias da imunidade inata são as células fagocíticas. As células NK constituem cerca de 70% dos leucócitos na decídua e parecem ser moduladores do sistema imune inato na reprodução(73,75): contribuem para o predomínio Th2 e respectivas citocinas na gravidez, condicionam uma menor produção de IFN- $\gamma$ (63) e associam-se à indução das Tregs(75). Globalmente, o conseqüente aumento da imunidade inata pode também ser a razão pela qual a mãe está protegida contra infecções, durante a gravidez(63).

### 1.5.1.3 Estado da imunidade adaptiva na gravidez

As células reguladoras Tregs têm uma função imunossupressora potente e contribuem para a auto-tolerância imunológica, sendo essenciais para placentação bem sucedida. Sabe-se que parte importante da tolerância transitória decorre das células Tregs(76,77), as quais são essenciais na implantação, sobrevivência fetal(40) e manutenção da gravidez(78,79). Esta hipótese é atestada pelo seu elevado número no período placentar primordial, onde se pensa que suprimam as respostas proliferativas das células T CD4+CD25-, atingindo depois o pico no 2º trimestre e declinando no pós-parto(80). Diversos estudos(81,82) demonstram que mulheres com valores diminuídos ou disfuncionais de Tregs, sofrem perdas fetais recorrentes e infertilidade. As células Tregs estão aumentadas na gravidez normal e diminuídas nos casos de perda de gravidez e pré-eclâmpsia. Para além disso, a resposta imune materna na interface materno-fetal também parece ser assegurada pelas células dendríticas e pela anergia das células T induzida pelo IDO(63,75) (ver 1.5.2.2 e 1.5.2.5).

## 1.5.2 Hormonas na gravidez

A produção de hormonas, dentro e entre os compartimentos placentários, fetais e maternos, é fundamental para o crescimento e desenvolvimento fetal(83)

### A hCG

Logo que o produto de concepção se implanta no endométrio, a hormona gonadotrófica coriónica (hCG), uma glicoproteína heterodimérica placentar imprescindível à manutenção da gravidez, é uma das primeiras moléculas a ser produzidas pelo embrião(84). No início da gravidez, a hCG é sintetizada pelo blastocisto de 6 a 8 dias(85) e mais tarde pelo sincitio-trofoblasto(86). A determinação da sua concentração sérica, que permite o diagnóstico da gravidez, pode ser realizada a partir do 8-10º dia depois da implantação: durante o primeiro trimestre da gravidez, os valores séricos duplicam a cada dois dias, atingindo o pico pela 10ª-11ª semana de gestação (correlacionando-se, inicialmente, com a idade gestacional), e diminuindo para 10% do valor máximo no segundo e terceiro trimestres da gestação(87).

Uma das funções primordiais da hCG é a a manutenção do corpo lúteo e estimulação da síntese de estrogénios e de progesterona a nível do ovário, até que a placenta esteja bem formada, o que ocorre por volta da 10ª semana de gestação(13). Para além desta função, a hCG está também envolvida num conjunto de processos cruciais da gravidez: a diferenciação e invasão do trofoblasto, a acção na implantação e tolerância embrionária, a preparação de um ambiente uterino adequado (aumentando a proliferação de miócitos e inibindo a sua contractilidade), a estimulação da vasculogénese (participando activamente no desenvolvimento placentar) e finalmente, através da interacção endócrino-imunológica, a regulação da relação imune materno-fetal(13,83,84).

As suas propriedades imunoreguladoras, consideradas fundamentais no sucesso dos processos de invasão, implantação e decidualização, incluem a supressão das células Th1, dos linfócitos CD8+ e dos macrófagos, a estimulação das células Th2 e o aumento do rácio CD4+CD25+/CD4+,(84) assim como pela atracção dos Tregs para a interface materno-fetal(80)(a este propósito, ver também 2.4.5.2.).

#### 1.5.2.1 A hCG e o balanço Th1/Th2

A hCG está implicada no equilíbrio das citoquinas libertadas pelas células Th1 e Th2, caracterizado por uma prevalência inicial de citoquinas Th2, seguido por uma mudança progressiva no

sentido do predomínio Th1, no final da gravidez. Quando este equilíbrio se altera pode ocorrer a produção de citocinas inflamatórias associadas a resultados adversos da gravidez (84).

#### 1.5.2.2 A hCG e as células Tregs

A tolerância transitória que ocorre durante a gravidez é conseguida, pelo menos parcialmente, pelo aumento da presença de células Tregs, que plausivelmente são atraídas para a interface feto-materna pela elevada produção de hCG pelo blastocisto e depois pelo trofoblasto(80).

#### 1.5.2.3 A hCG e as células NK

A hCG é também um regulador da proliferação da população de células *natural killer* NK, que representam cerca de 70% dos linfócitos presentes do endométrio do útero grávido. O seu número vai aumentando desde a decidualização, implantação e placentação, tornando-se nos linfócitos predominantes no 1º trimestre. O seu papel é muito importante na remodelação das artérias espirais, necessárias para um fornecimento vascular adequado da placenta(84) (a este propósito ver 1.5.1.2.)

#### 1.5.2.4 A hCG e os macrófagos

A hCG promove as funções inatas dos macrófagos, como a *clearance* das células apoptóticas, as quais são muito relevantes para a manutenção da gravidez (63).

#### 1.5.2.5 O efeito da hCG na Indolamina-2,3-dioxigenase (IDO)

A indolamina-2,3-dioxigenase IDO é um enzima expressa nas células dendríticas apresentadoras de antígeno, nos tecidos linfóides e da placenta, que está envolvido no catabolismo do aminoácido triptofano. Munn(88) colocou a hipótese de que a expressão da IDO nas células apresentadoras de antígeno permitiria controlar as respostas imunes autoreactivas pela inibição das células T. Posteriormente, Mellor postulou que a via da IDO estaria envolvida nos mecanismos de tolerância periférica adquirida e de tolerância materno-fetal(15,89), através da supressão IDO-dependente das respostas imunes das células T, podendo desse modo funcionar como um mecanismo imunorregulador natural. O quadro 8 resume a actividade fisiológica conhecida do IDO que mais provavelmente se encontra implicada na tolerância imunológica.

**Quadro 8. Evidências que suportam o papel imunoregulador do IDO**

<b>Efeito do IDO</b>	<b>Tipo de célula IDO+</b>
Inibição da proliferação das células T <i>in vitro</i> (humanos)	Monócitos derivados de macrófagos
Apoptose dos clones da célula Th1 <i>in vitro</i>	CD8 <sup>+</sup> DCs
Inibição da proliferação das células T <i>in vitro</i>	DCs plasmacitoides
Protecção do feto	Células trofoblásticas
Inibição da activação pelo antígeno da células T	DCs activadas pelo INF $\gamma$
Tolerância espontânea aos Tx hepáticos	Não determinadas
Destruição atrasada das células dos ilhéus pelas células T diabéticas não obesas (NOD)	Células dos ilhéus pancreáticos
Tolerância para enxertos de tecido pancreático exócrino	DCs IDO+
Supressão das células T aloreactivas <i>in vivo</i>	DCs IDO+
Protecção dos transplantes pulmonares	Não determinadas
Melhoria da colite induzida por ác. sulfónico trinitribenzeno (TNBS)	Não determinadas
Melhoria da Encefalomielite autoimmune experimental (EAE)	Não determinadas
Inibição da Asma Experimental	Células Pulmonares residentes
Correlação temporal com resistência à diabetes autoimune	Não determinadas
Protecção da rejeição de linhas celulares tumorais	Linha celular P815
Indução <i>in vivo</i> da anergia às células T CD8 <sup>+</sup>	DCs plasmacitoides

*Adaptado de: Mellor AL, Munn DH. IdO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol. 2004 Oct;4(10):762–74.*

**i) O IDO na evolução do sistema imunológico**

O gene estrutural que codifica a indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é filogeneticamente mais antigo do que o sistema imune adaptativo, sendo no entanto muito sensível aos sinais deste último. Pensa-se que inicialmente o IDO tenha evoluído pela utilização de uma simples estratégia primitiva anti-microbiana de competição por nutrientes; à medida que o sistema imune adaptativo evoluiu, as células APC (células apresentadoras de antígenos - macrófagos e células dendríticas) confrontaram-se com uma “nova população hostil”, as células T autoreactivas, pensando-se que o IDO tenha co-evoluído com estas últimas(90). O IDO representa ainda um importante passo evolutivo enquanto factor regulador da actividade das células Tregs, es-

tabilizando e aumentando o fenótipo supressivo, impedindo assim a reprogramação das Treg em células T helper não-supressoras. Evidências emergentes ligam a via da IDO com os Tregs: a primeira evidência surge da capacidade das células dendríticas que expressam IDO de induzir a diferenciação das células TCD4+ “naive” no fenótipo iTregs Foxp3+; a segunda reside na capacidade das células dendríticas que expressam IDO, de directamente activarem os Tregs maduros pré-existentes para uma maior supressão das células-alvo; a terceira evidência resulta da capacidade da IDO de prevenir a conversão induzida por inflamação (“reprogramação”) de Tregs em células T helper pró-inflamatórias *in vivo*(91).

## ii) Regulação da actividade funcional da IDO

A IDO é uma enzima intracelular, não existindo nenhuma forma conhecida de IDO extracelular. A expressão funcional da enzima IDO ocorre em maior proporção no epidídimo, íleo distal e cólon, nódulos linfáticos, baço, timo, pulmões e na interface materno-fetal. Nesta última, resulta da expressão constitucional nas células extravilositárias do trofoblasto humano, induzida pela hCG(92). A indução sistémica da IDO nas células dendríticas, pela hCG, é responsável pela tolerância materna de natureza transitória que ocorre na gravidez. A sua expressão acentuada resulta em imunossupressão e tolerância imunológica e funciona como mecanismo anti-inflamatório e/ou imunossupressor(90). Ueno et al apontam a hCG como a hormona responsável pela protecção materna à autoimunidade(93).

Os referidos mecanismos ocorrem tanto no local de exposição ao antigénio fetal, como a nível sistémico, operando em paralelo para sustentar a gestação(63), prevenindo a rejeição do feto(15,90,91).

Deste modo, se para o sucesso da implantação é necessário um endométrio receptivo, um blastocisto normal e um diálogo na interface maternal-fetal, para a progressão da gravidez é obrigatória a tolerância imunológica. O diálogo entre os sistemas imune e endócrino é intermediado por uma cascata de citocinas, constituindo a hCG o primeiro sinal através do qual o embrião influencia profundamente a tolerância imunológica na interface materno-fetal. Os níveis de hCG coincidem com o desenvolvimento da tolerância do trofoblasto, e modulam o equilíbrio Th1/Th2. A tolerância transitória que ocorre durante a gravidez é, pelo menos em parte, conseguida pela presença das Tregs e estas são por sua vez atraídas pela hCG para a interface materno-fetal. Finalmente, a estimulação das células dendríticas pela hCG resulta numa estimulação da classe II do CMH, da IL-10 e da expressão da IDO(84).

## Estrogénios

Os estrogénios (estradiol, estriol e estrona) são hormonas produzidas nos ovários, que também estão envolvidas na imunomodulação, podendo afectar os sistemas imunes inato e adaptativo(94). Durante a evolução de uma gravidez normal, e até ao final da mesma, há um aumento da secreção dos estrogénios produzidos pela placenta.

## Progesterona

A progesterona é uma hormona produzida pelo ovário ou pela placenta e os seus níveis também aumentam à medida que progride a gravidez. A progesterona prepara o endométrio (fase secretora) para a implantação, inibindo o músculo liso do útero e diminuindo a produção de prostaglandinas, as quais permitem que o feto cresça no útero em expansão.

Os estrogénios e a progesterona secretadas durante a gravidez modulam o equilíbrio Th1/Th2 e direccionam-no no sentido do fenótipo Th2(21,95), com consequente activação de células B e produção de anticorpos(63,96).

### 1.5.3 A gravidez em doentes com doenças autoimunes

A gravidez pode afectar diferentemente o curso clínico de diversas doenças autoimunes, com importantes consequências tanto para a mãe como para o feto. As hormonas sexuais femininas desempenham um papel modulador importante da resposta imune e das doenças inflamatórias/autoimunes crónicas, durante a gravidez(97): como já foi realçado, o ambiente hormonal da gravidez favorece a resposta Th2 e a progressão da resposta imune Th1 é interrompida.

Pelo que tem sido afirmado, parece plausível afirmar que as alterações hormonais e imunológicas da gravidez e do período pós-parto afectam o desenvolvimento das doenças autoimunes(9). Nos últimos anos ocorreram melhorias no diagnóstico e no manejo clínico destas doenças, resultando numa melhor qualidade de vida e na possibilidade de planeamento familiar corrente. Nessas circunstâncias, a proporção de gravidezes bem sucedida nas portadoras de doença autoimune tem vindo a aumentar, nomeadamente nas fases de remissão e nos casos seguidos por equipas multidisciplinares com experiência específica nesta área(62).

Serão focadas algumas doenças auto-imunes mais prevalentes que podem ser consideradas como exemplos de aspectos autoimunes clinicamente relevantes que ocorrem na gravidez.

### 1.5.3.1 Lúpus Eritematoso Sistémico (LES)

Durante muito tempo, a gravidez foi desaconselhada pela comunidade médica nas situações de LES, por risco de complicações materno-fetais(62,98). No final de 1950, a gravidez ocorria apenas em uma em cada 1.500 doentes com LES e mesmo essa pequena proporção estava frequentemente associada a exacerbações da doença, a morte fetal e a morte materna(99). Com o aparecimento de terapêuticas mais eficazes no alívio dos sintomas sistémicos e da progressão da doença, tem sido possível aumentar o número de gestações e melhorar o desfecho das mesmas(98,100). As complicações maternas e fetais (eg, recidiva da doença, trombose materna (com ou sem SAF), toxicidade, síndrome lúpus neonatal, aborto espontâneo e partos prematuros, entre outros)(100) podem ser minimizadas por um planeamento cuidadoso do momento apropriado para a concepção (após período prolongado de remissão ou de baixa actividade da doença), assim como por uma optimização da terapêutica(101).

A combinação de sinais de actividade clínica, de serologia alterada (factores do complemento e dsDNA), de proteinúria, síndrome antifosfolípido, trombocitopenia ou hipertensão constituem factores preditivos de resultados adversos na gravidez com LES(102). Os sistemas de pontuação (SLEDAI) relacionados com actividade já foram adaptados como ferramentas de diagnóstico para os “flares” lúpicos durante a gravidez e o puerpério.

A fertilidade em doentes com LES pode não estar significativamente prejudicada, principalmente se não se verificar a ocorrência de doença activa grave, doença renal em estadio terminal e consumo de medicamentos citotóxicos. Ainda assim, existe uma maior susceptibilidade à ocorrência de pré-eclâmpsia, nomeadamente na presença de nefrite lúpica, hipertensão induzida por esteróides e hiperglicemia(10).

### 1.5.3.2 Síndrome Antifosfolípido (SAF)

Estão descritos diversos problemas obstétricos que podem decorrer do depósito de uma subpopulação heterogénea de anticorpos (com maior relevância para os anti  $\beta$ 2-Glicoproteína I) na placenta, tais como: (i) problemas trombóticos na placenta; (ii) problemas inflamatórios na placenta, após activação do complemento; e (iii) efeito directo dos anticorpos nas células do trofoblasto, induzindo insuficiência útero-placentária, podendo levar à morte fetal (118). A taxa de aborto, em doentes não tratadas, pode chegar aos 90% (103). A gravidez de mulheres com LES e SAF pode ainda ser complicada por outros problemas obstétricos, também associados com a placentação anormal, tais como a pré-eclâmpsia, a restrição de crescimento

fetal (RCF) e o parto pré-termo (40%)(103). Estes eventos têm-se modificado pelo uso da aspirina (75-100 mg/d), com ou sem heparina de baixo peso molecular(10), com uma taxa de sucesso de 80% de nascimentos sem eventos adversos associados.

### 1.5.3.3 Artrite Reumatóide (AR)

A artrite reumatóide é uma doença autoimune que afecta predominantemente o sexo feminino, com o pico de aparecimento após os 40 anos de idade(104). A ocorrência de AR clinicamente significativa em grávidas é baixa (10-20%), verificando-se uma redução sintomática em cerca de 70% das grávidas com AR(105,106). Adicionalmente, a gravidez em mulheres com AR não parece associar-se à ocorrência acrescida de resultados adversos, tais como parto pré-termo, pré-eclâmpsia ou RCF(62,107). A melhoria dos sintomas, descrita por Hench em 1938(108), é temporária, ocorrendo um risco elevado de exacerbação da doença três ou quatro meses após o parto(109).

Apesar deste resultados, alguns autores defendem que em mulheres com doença activa durante a gravidez poderá existir um risco acrescido de ocorrência de resultados adversos: Skomsvoll(110), usando uma base dados de todos os nascimentos na Noruega durante 30 anos, demonstrou nas mulheres com artrite reumatóide um risco aumentado de pré-eclâmpsia, prematuridade, cesariana e bebés pequenos para idade gestacional(111). Também nas grávidas com AR é observada uma expansão da população de Tregs(68), ocorrendo um ambiente de citocinas anti-inflamatórias, sobretudo no terceiro trimestre, altura que corresponde ao expoente máximo da melhoria da actividade da doença(69).

## **1.5.4 O efeito da gravidez na gravidade das doenças autoimunes**

### 1.5.4.1 O efeito da gravidez na gravidade do Lúpus Eritematoso Sistémico

A taxa de exacerbação lúpica documentada na literatura não gera consensos, estando descritas variações entre 13 e 60%(112). Os estudos que investigaram o impacto da gravidez no LES chegaram a diferentes resultados: enquanto que alguns autores defendem a ideia de que a gravidez não está implicada na exacerbação da doença(113,114), outros consideram que o aumento da frequência das exacerbações traduz um impacto directo da gravidez na história natural da doença(115,116). A larga variação documentada pode ser explicada pela aplicação de mais do que uma tabela de caracterização de exacerbações lúpicas(112), pelas diferentes

populações controlas e pela dificuldade no diagnóstico diferencial entre exacerbações, alterações fisiológicas da gravidez e complicações hipertensivas da mesma(101).

Algumas manifestações clínicas típicas da gravidez podem ser idênticas a alguns sintomas da doença activa: artralguas, mialguas, eritema nas eminências malares e nas palmas da mão, perda de cabelo, edema da face, mãos e dos membros inferiores e síndrome do túnel do cárpico. Alguns dos parâmetros laboratoriais que são úteis para avaliar a actividade de LES podem alterar-se durante a gravidez: aumento da velocidade de sedimentação, diminuição da hemoglobina por hemodiluição, aumento dos níveis séricos de C3 e C4 por maior síntese hepática induzida pelos estrogénios.

Diferentes índices de actividade, designadamente o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), o SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*) e o LAI (*Lupus Activity Index*) foram adaptados para serem utilizados especificamente na caracterização da doença na gravidez(117,118), com outros nomes: i) *SLE Pregnancy Disease Activity Index* [SLEPDAI]; ii) *Lupus Activity Index in Pregnancy* [LAI-P], e o iii) *Systemic Lupus Activity Measure* modificado [m-SLAM]). O SLEPDAI e o LAI-P foram já validados nas grávidas com LES(118), apresentando uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 98%(98). A modificação destes índices permite o diagnóstico diferencial entre as complicações da gravidez e as exacerbações no LES(36).

Embora em 30% dos casos o LES se mantenha mais ou menos estável durante a gravidez(119), a ocorrência de exacerbações do LES é maior em doentes grávidas do que em não-grávidas(115). As exacerbações parecem estar dependentes da actividade da doença materna nos 6-12 meses(98,101,120) anteriores à concepção: quando o LES está activo nesse período, existe um risco elevado de agravamento sintomatológico na gravidez(121). A presença de glomerulonefrite activa na altura da concepção constitui um factor de risco agravado(98,122).

Durante a gravidez, as exacerbações mais graves são as que atingem os órgão-alvo, nomeadamente os rins (em 46%) e o sistema nervoso central (em 13%)(101). O atingimento renal tem um impacto muito significativo no desempenho fetal e materno(62,100), ainda que actualmente seja muito rara a ocorrência da morte materna no contexto de uma gravidez complicada por LES(98).

No período pós-parto, os factores de risco para a ocorrência das exacerbações são a actividade da doença durante a gravidez, a hipoalbuminémia, a proteinúria, a presença de títulos elevados de ac. anti-dsDNA, assim como o uso de prednisona e hidroxicloroquina durante gravidez(92,123).

### 1.5.5 Efeito da doença autoimune no desfecho da gravidez

Os desfechos desfavoráveis da gravidez associadas às doenças autoimunes maternas são tão importantes, do ponto de vista quantitativo, como os decorrentes das malformações uterinas e das anomalias cromossómicas parentais(124,125). Estes desfechos podem ser genericamente divididos entre risco maternos e riscos fetais adversos.

Os riscos maternos incluem as complicações hipertensivas (10-30%), particularmente em situações de exacerbação lúpica, de nefrite lúpica e de síndrome antifosfolípico, tornando difícil o diagnóstico diferencial entre a exacerbação lúpica e a pré-eclâmpsia<sup>6</sup>.

Os efeitos fetais e neonatais adversos incluem as perturbações do crescimento fetal (RCF e recém-nascidos de baixo peso - cerca de 22,3%), o aumento da taxa de prematuridade (cerca de 20%) e de parto pré-termo (20%)(36) e o risco de morte fetal (aborto, nado-morto, morte neonatal) (5 vezes superior ao das gravidezes não lúpicas)(36). Os factores envolvidos nos efeitos fetais e neonatais adversos na gravidez com LES activo incluem as complicações hipertensivas, o grau de actividade da doença na altura da concepção, a nefrite lúpica e os anticorpos anti-fosfolípidos(36,101). O risco de morte fetal é maior se a nefrite lúpica, a hipertensão e os anticorpos antifosfolípidos estiverem presentes na concepção(101,124). Na nefrite lúpica, a taxa de prematuridade associada a mau prognóstico perinatal é elevada, atingindo os 74.1%. A doença renal activa está associada a perda fetal/abortos (8-24%), assim como a uma percentagem de 4-24% de nados mortos e mortes neonatais(10,36,101,112).

O síndrome de lúpus neonatal (SLN) (com bloqueio congénito cardíaco completo ou incompleto) constitui um outro importante efeito fetal adverso que ocorre na gravidez em doentes autoimunes(112,126). É um síndrome complexo, consequência da passagem transplacentar dos anticorpos maternos anti-Ro/SS-A e/ou anti-La/SS-B da classe IgG, independentemente da actividade da doença materna(127). Apresenta-se clinicamente como um lúpus cutâneo subagudo (*rash* fotossensível), associado a anomalias hematológicas (trombocitopénia, neutropénia ou anemia) em cerca de 27% dos casos e a alterações hepáticas (com elevação das enzimas hepáticas), em cerca de 10%. Os aspectos clínicos referidos podem ter uma duração de 6-8 meses, no entanto o bloqueio congénito cardíaco completo ou incompleto, quando

---

6. Nestas duas condições sobrepoem-se muitas anomalias clínicas e laboratoriais: o edema, a hipertensão arterial, a trombocitopénia, as coagulopatias e a proteinúria. O diagnóstico diferencial depende de testes laboratoriais como o sedimento urinário com a presença de dismorfismo eritrocitário e cilindros celulares, hipocomplementémia e aumento dos títulos de anti-dsDNA, no caso da nefrite lúpica e de proteinúria isolada, no caso da PE.

ocorre (2%), modifica irreversivelmente o tecido cardíaco(62), com uma morbidade e mortalidade significativa. A forma de apresentação mais comum é um bloqueio AV completo num feto de uma mãe saudável e assintomática (em 85% dos casos com anticorpos anti-SSA/Ro-SSB/La). Os anticorpos anti-Ro/SSA não afectam negativamente outros resultados da gravidez(102,128).

O síndrome antifosfolípídico não é significativamente diferente dos outros factores de risco das grávidas com lúpus, no que diz respeito à perda fetal ou anormalias placentares(112). As doentes com síndrome antifosfolípídico podem apresentar abortos de repetição espontâneos, tanto no período embrionário (<10 semanas de gestação) como no período fetal (10 ou mais semanas de gestação), RCE, insuficiência placentar e PE.

Nos últimos 40 anos e com a melhor compreensão da díade materno-fetal no lúpus tem sido possível obter melhor resultados das gravidezes(36), mas o velho dogma que aconselha as mulheres com lúpus a não engravidarem, excepto se a doença estiver estável, mantém-se válido. A concepção deve ser planeada e as doentes devem ser manejadas em contexto multidisciplinar(129).

#### 1.5.5.1 Defechos adversos recorrentes na gravidez em doenças autoimunes

Desfechos adversos recorrentes e complicações em gravidezes subsequentes estão aumentados em mulheres com doenças autoimunes reumáticas. Os desfechos adversos em gravidezes anteriores são preditores de desfechos adversos em gravidezes subsequentes e as doenças autoimunes sistémicas aumentam o risco de recorrência de desfechos adversos até 2 vezes, independentemente da altura do diagnóstico(130).

## CAPÍTULO 2

# Diagnóstico Pré-Natal

## 2.1 FUNDAMENTOS

É estimado que as anomalias congénitas<sup>7</sup>, que constituem as principais causas de morbilidade e mortalidade perinatal, afectem cerca de 2% dos recém-nascidos(131). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2012, referem que 1 em cada 33 crianças são afectadas por anomalias congénitas, anualmente, e que cerca de 270.000 crianças morrem, também anualmente, nos primeiros 28 dias de vida, de causas decorrentes a anomalias congénitas. O rastreio prenatal possibilita que a presença de algumas destas anomalias congénitas (nomeadamente as alterações cromossómicas ou aneuploidias) possa ser suspeitada antes do nascimento, constituindo-se como a indicação mais frequente para diagnóstico pré-natal invasivo(132). O número e tipo de anomalias suspeitadas antes do nascimento dependem de um conjunto de factores (eg, testes disponíveis, testes utilizados, exactidão, experiência dos operadores) que variam entre diferentes centros e países(133,134). No figura 2 está reportada a taxa de detecção da trissomia 21, nos diferentes países europeus, de acordo com o tipo de rastreio que é utilizado em cada um deles e com o tipo de ferramentas utilizadas pelos profissionais. A taxa de detecção em Portugal, estimada pelo Eurocat-Network no período compreendido entre 2007 e 2011, foi de 48%, o que está de acordo com a taxa de detecção reportada pela norma 023/2011 da Direcção Geral da Saúde (45%).

---

7. Anomalias congénitas (também designadas de defeitos congénitos, malformações congénitas ou defeitos de nascença) são anomalias de desenvolvimento morfológicas, estruturais, funcionais, moleculares, incluindo alterações metabólicas, presentes no momento do nascimento. As anomalias congénitas podem ser cromossómicas ou não cromossómicas. As anomalias congénitas mais comuns são os defeitos cardíacos, os defeitos do tubo neural e o síndrome de Down(OMS, 2012).

**Figura 2.** Taxas de deteção prenatal do Síndrome de Down, 2007-2011

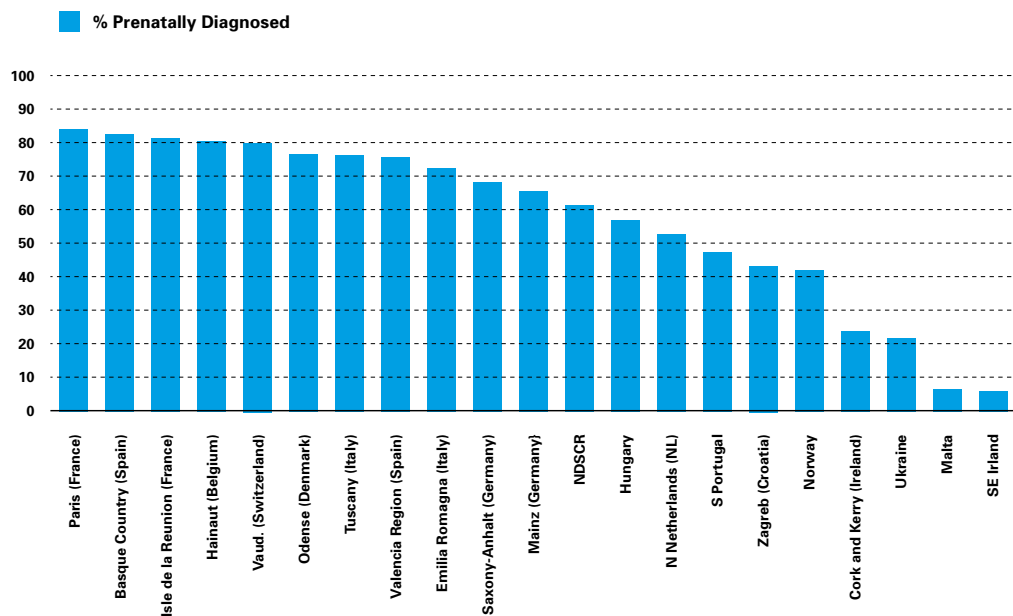


Gráfico adaptado de [eurocat-network.eu](http://eurocat-network.eu) (european surveillance of congenital anomalies);  
 Taxa de deteção prenatal em Portugal no período de 2007-2011 – 48%.

### 2.1.1 Prevalência das Aneuploidias

As aneuploidias são anomalias cromossómicas que consistem numa variação numérica envolvendo cromossomas individuais (e não grupos de cromossomas). São causadas pela não-disjunção meiótica de origem materna em mais de 90% dos casos, embora 5% dos casos envolvam um cromossoma adicional de origem paterna e uma pequena proporção (2%) seja consequência de uma não-disjunção mitótica pós-zigótica(135). Na maior parte das aneuploidias ocorre o aborto espontâneo do feto, embora em determinadas circunstâncias a gestação possa chegar ao seu termo.

A aneuploidia mais frequente é a trissomia 21 (síndrome de Down), seguida da trissomia 18 (síndrome de Edward) e da trissomia 13 (síndrome de Patau); o outro grupo de aneuploidias inclui as aneuploidias ligadas aos cromossomas sexuais (Quadro 9.).

**Quadro 9. Casos e prevalência (por 10,000 nascimentos-vivos) para todos os países membros da eurocat, desde 2007-2011**

	<b>NV (n)</b>	<b>MF/NM (n)</b>	<b>IMG (n)</b>	<b>Total (n)</b>	<b>Taxa (95%IC)</b>
<b>Anomalias Cromossómicas</b>	8197	653	9205	18055	29.48 (29.05-9.91)
<b>Síndrome de Down</b>	5715	238	4998	10951	17.88 (17.54-8.22)
<b>Síndrome Edwards/trissomia 18</b>	465	176	1715	2356	3.85 (3.69-4.00)
<b>Síndrome Patau/trissomia 13</b>	212	47	669	928	1.52 (1.42-1.62)
<b>Síndrome Turner</b>	302	71	658	1031	1.68 (1.58-1.79)
<b>Síndrome Klinefelter</b>	200	6	123	329	0.54 (0.48-0.60)

NV- nados vivos; MF/NM – morte fetal/nado.morto; IMG – interrupção médica da gravidez. (Adaptado de eurocat.)

A incidência das três principais trissomias (21, 18, 13) aumenta significativamente com a idade materna. Este aspecto é de particular importância nos países ocidentais industrializados, nos quais a idade média materna à data do parto do primeiro filho tem vindo progressivamente a aumentar nas últimas décadas (Quadro 10.). Consequentemente, a prevalência das principais trissomias tem vindo também a aumentar, tendo passado, no caso da trissomia 21, de 1:740 em 1974 para 1:629 em 2005(136,137) (ver também 2.1.2.2.3.).

**Quadro 10. Prevalência de nascimentos com mais de 35 anos, em alguns países europeus (dados de Eurostat e Comissão Europeia (ec.europeia.eu))**

	<b>França</b>	<b>Finlândia</b>	<b>Alemanha</b>	<b>Grécia</b>	<b>Reino Unido</b>	<b>Portugal</b>
<b>2001</b>	15,8%	19,0%	17,0%	14,2%	17,3%	14,0%
<b>2008</b>	19,0%	18,2%	21,8%	20,9%	20,1%	19,2%
<b>2011</b>	19,2%	18,8%	21,7%	23,8%	20,0%	23,9%

### 2.1.1.1 Trissomia 21

O síndrome de Down (SD) foi formalmente descrito em 1886, mas só em 1959 se confirmou a sua associação com a presença de uma trissomia no cromossoma 21, o cromossoma autosómico humano de menor dimensão(138).

A trissomia 21 é a anomalia cromossómica mais frequente em nados-vivos, sendo a sua prevalência, em números globais, de 1:629 nascimentos-vivos(136). Geneticamente, pode resultar

da presença extra de um cromossoma 21 (90-95%), de translocação cromossômica (1-7%) ou ainda de mosaicismo (1-7%)(139). A prevalência aumenta com a idade materna, pelo que o risco é cerca de 1:1340 aos 25 anos; 1:353 aos 35 anos e 1:35 aos 45 anos(140-142) (Quadro 11.).

O fenótipo do SD é complexo e apresenta uma grande variação interpessoal, podendo apresentar uma combinação de aspectos dismórficos e de atraso no desenvolvimento. Algumas das características morfológicas são muito características, tais como baixa estatura, baixa implantação do pavilhão auricular, hipoplasia nasal, pregas no epicanto, prega palmar, espaço alargado entre o 1º e 2º dedo da mão, hipotonia muscular e microcefalia (com deficiência intelectual moderada a grave). Os defeitos congénitos cardíacos (eg, defeito no septo auricular, defeito no septo ventricular, tetralogia de Fallot, ductus arterial patente), atingem cerca de 50-70% das crianças e constituem a causa mais importante de morbidade e mortalidade nestes doentes. Podem igualmente surgir problemas gastro-intestinais, oculares e auditivos (surdez neurosensorial, de condução ou mista), assim como déficits imunológicos. Cerca de 90% dos doentes SD sobrevivem ao primeiro ano de vida, mas a idade média de vida está caracteristicamente encurtada (aproximadamente 49 anos).

#### 2.1.1.2 Trissomia 18

A trissomia 18, descrita em 1960 por Edwards, é a segunda trissomia autossómica mais comum, caracterizando-se pela presença de uma cópia extra ou de parte do cromossoma 18 (translocação cromossômica), ou ainda de um mosaicismo. A sua prevalência é de 1:6500 recém-nascidos, com um risco associado ao aumento da idade materna no momento da gravidez (Quadro 11.).

As crianças nascidas com síndrome de Edwards podem ter algumas ou todas as seguintes características: restrição de crescimento fetal, atrofamento grave de todos os órgãos e sistemas (malformações renais, defeitos cardíacos, etc.), onfalocelo, atresia esofágica, microcefalia, micrognatia, lábio leporino, atraso mental, baixa implantação de pavilhões auriculares malformados; fissuras palpebrais; hipertelorismo ocular; ptose; mãos em garra; quistos do plexo coróideus; pé boto; criptorquidia, entre outras malformações.

Metade dos bebés morrem na primeira semana de vida e cerca de 95% morrem antes do 1º ano de vida. Quando a Trissomia 18 é parcial ou resulta de mosaicismo, a expressão clínica é menos grave e a sobrevida é superior, apesar dos graves déficits intelectuais(140).

### 2.1.1.3 Trissomia 13

A trissomia 13 ou síndrome de Patau é causado por uma cópia extra do cromossoma 13, um cromossoma acrocêntrico de médio tamanho. É o síndrome menos comum, com uma prevalência de 1:12500 recém-nascidos, sendo também, das trissomias autossômicas, a que apresenta alterações morfológicas mais graves. Os recém-nascidos têm numerosas anomalias internas e externas; holoprosenfalia, polidactilia, fenda facial, defeitos do tubo neural, convulsões, anomalias cardíacas graves, atraso mental grave, etc. Sobrevivem, para além da primeira infância, menos de 20% das crianças, invariavelmente com graves deficiências e limitações. A sobrevida média é de menos de 3 dias(140).

### 2.1.1.4 Aneuploidias dos cromossomas sexuais

As anomalias dos cromossomas sexuais (47,XXX; 47,XXY; 47,XYY; 45,X) ocorrem em média cada 2 a 3 por 1000 gravidezes, às 10-14 semanas de gestação, sendo as anomalias cromossômicas mais comuns em nados-vivos(143).

## **2.1.2 Definições**

Em seguida, são revistas as definições estatísticas assim como as definições usadas no rastreio pré-natal e no diagnóstico.

### 2.1.2.1 Definições estatísticas

**2.1.2.1.1 Teste de rastreio** é a aplicação sistemática de um teste ou inquérito com o objetivo de identificar sujeitos em risco suficiente de uma determinada doença, de modo a que possam beneficiar de futuras investigações ou acções preventivas directas(144). Embora não exista nenhuma definição de rastreio médico universalmente aceite, existe um consenso geral de que deve conter três elementos: (i) deve identificar os indivíduos que estão em risco elevado de vir a sofrer de uma determinada situação patológica, antes de lhes ser aplicado um teste diagnóstico ou se necessário, uma acção preventiva. (ii) deve ser oferecido sistematicamente a todas as pessoas, ainda sem sinais ou sintomas da patologia, da população-alvo. (iii) deve ser benéfico para os indivíduos que estão a ser sujeitos ao rastreio(145).

O resultado obtido é o agrupamento dos indivíduos rastreados em grupos de baixo ou alto risco. Um teste de rastreio não fornece uma resposta definitiva: os resultados dos testes de rastreio são considerados resultados presuntivos, até serem confirmados por testes diagnósticos. A avaliação do desempenho de um teste de rastreio é feita pela aplicação de determinadas medidas: taxa de detecção, taxa de falsos positivos e probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (*odds of being affected given a positive result (OAPR)*). Um teste é tanto melhor quanto maiores forem a taxa de detecção e o OAPR, e mais baixo for a taxa de falsos positivos(145).

**2.1.2.1.2 Incidência** é o número de novos casos de uma condição específica, que ocorrem durante um determinado período de tempo, numa dada população. **Prevalência** é a proporção de pessoas numa dada população que têm uma determinada doença.

**2.1.2.1.3 Taxa de Detecção** é a proporção de indivíduos afectados, com resultados positivos num teste de rastreio. Indivíduos afectados são indivíduos que apresentam a doença para as quais estão a ser rastreados. Gravidezes afectadas são gravidezes em que o feto apresenta a doença-alvo do rastreio.

**2.1.2.1.4 Taxa de Falsos Positivos** é a proporção de gravidezes não afectadas com resultados positivos num teste de rastreio(145)

**2.1.2.1.5 Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo** (*Odds of being Affected given a Positive Result (OAPR)*) é uma forma equivalente de expressar o Valor Preditivo Positivo (VPP), correspondendo à relação entre o número de indivíduos afectados e os indivíduos não afectados com resultados positivos, ou seja positivos afectados/positivos não afectados(146). Embora equivalente ao VPP, expressa melhor o desempenho de um teste, quando o VPP é elevado(145). É a probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo(147) e é usada como medida de desempenho de um teste de rastreio. Por exemplo, um OAPR de 1:5 significa que entre as mulheres com um resultado de rastreio positivo, 1 delas terá uma gravidez afectada, para cada 4 que não a terão.

**2.1.2.1.6 Valor Preditivo Positivo (VPP)** é a proporção de pessoas com um resultado positivo que de facto apresentam a doença que está a ser rastreada. É a proporção de testes positivos que identificam correctamente as gravidezes com aneuploidias [número de verdadeiros positivos/(verdadeiros positivos + falsos positivos)]. **Valor Preditivo Negativo (VPN)** é também uma medida de desempenho de um teste de rastreio. É a proporção de pessoas com um resultado negativo num teste de rastreio que realmente não possuem a doença para a qual estão a ser rastreadas. É a proporção de testes negativos que identificam correctamente as gravidezes

não afectadas [número de verdadeiros negativos/(verdadeiros negativos + falsos negativos)]. Porque a prevalência do síndrome de Down é baixa, o VPN não é geralmente calculado(147).

**2.1.2.1.7 Sensibilidade** é uma medida de desempenho de um teste. Corresponde à proporção dos que têm a doença, que tiveram um resultado positivo no teste. É o mesmo que taxa de detecção. **Especificidade** é também uma medida de desempenho de um teste. É a proporção dos que não têm a doença, que tiveram um teste negativo. Quanto mais elevada for a especificidade, mais baixo é o número de falsos positivos.

**2.1.2.1.8 Resultado verdadeiro negativo** é o resultado negativo de um teste de rastreio encontrado naqueles que não apresentam a doença para a qual foram rastreados. **Resultado verdadeiro positivo** é o resultado positivo de um teste de rastreio encontrado naqueles que apresentam a doença para a qual foram rastreados.

#### **2.1.2.1.9 Múltiplos da Mediana (MoM's)**

Os valores de MoM são calculados pela razão entre o valor individual da grávida em estudo e a mediana desse marcador para a população de grávidas sem aneuploidias, na mesma idade gestacional, que consta no algoritmo de risco: deste modo, as flutuações gestacionais que ocorrem nas concentrações proteicas são removidas, já que a conversão das unidades de massa ou das unidades internacionais em múltiplos da mediana (MoM), para uma dada idade gestacional, permite que cada uma das medições analíticas possa ser correctamente interpretada(147).

As distribuições dos valores dos MoM nas gravidezes normais e nas gravidezes com fetos portadores de síndromes de Down geralmente seguem uma distribuição Gaussiana quando o MoM sofre uma transformação logarítmica; apesar de uma sobreposição significativa das duas populações, é possível estabelecer a probabilidade de que um qualquer resultado possa vir da população de resultados associados com o síndrome de Down(137). Os valores das MoM resultantes são afectados pela idade materna e idade gestacional, mas também por outros factores como o peso, a origem étnica, a presença ou não de DMID, a gravidez múltipla e o tabagismo. Os algoritmos de risco levam estes factores em consideração como factores de correcção, às quais as variáveis são ajustadas (ver 2.4.6)(147).

### 2.1.2.2 Definições no âmbito Pré-Natal

**2.1.2.2.1 Rastreo pré-natal** envolve a aplicação de testes não invasivos para a identificação de risco acrescido de anomalias congénitas. Os resultados dos testes de rastreio são necessariamente presuntivos, pelo que no caso de risco acrescido deve ser colocada a indicação para realizar um teste diagnóstico(133).

Organismos oficiais como o Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG)(148), o NICE(149) e a Direcção Geral de Saúde (desde 2011)(150) recomendam que a todas as grávidas seja oferecida a possibilidade de rastreio de anomalias cromossómicas, independentemente da idade materna. Existem diversas possibilidades de rastreio pré-natal, incluindo a medição de parâmetros bioquímicos séricos, que são interpretados no contexto da idade materna, e a medição ecográfica da translucência da nuca (ver 2.1.2.2.4, 2.4.4.2. e 2.2.1.)

**2.1.2.2.2 Idade gestacional** é a duração de uma gravidez que está a decorrer ou que já foi completada, medida desde o primeiro dia do último período menstrual (geralmente cerca de 2 semanas mais longa do que a data real da concepção). A idade gestacional é medida em semanas e dias(133). A verdadeira idade gestacional depende de uma correcta datação da gravidez e esta última é um pré-requisito essencial para um correcto rastreio pré-natal. Como a maior parte das gestantes desconhece a data da última menstruação ou tem ciclos irregulares, a idade gestacional deve ser calculada, entre as 11 e as 13 semanas + 6 dias, a partir da medição de um dos dois parâmetros mais comumente medidos para a datação da gravidez: o comprimento crâneo-caudal (CCC) (ver 2.4.4.1)(151) ou o diâmetro biparietal. O CCC é recomendado para a aferição da idade gestacional, sobretudo se o feto tem menos de 84 mm. A partir desta etapa, é recomendado que se use à circunferência cefálica, pois é mais precisa que o diâmetro biparietal(152).

**2.1.2.2.3 Rastreo pré-natal pela idade materna** Cada grávida sujeita ao rastreio pré-natal têm um risco *à priori* (designado de ‘risco basal’), baseado na sua idade e na idade gestacional da sua gravidez. O rastreio para despiste do SD pela idade materna teve início há mais de quatro décadas atrás, quando a amniocentese era indicada apenas às mulheres com mais de 40 anos (145). No início de 1990, a população de mulheres grávidas com mais de 35 anos correspondia a cerca de 5%, mas continha aproximadamente 30% do número total de fetos com trissomia 21. Deste modo, o rastreio pela idade materna, de acordo com a definição de grupo de alto risco baseada no ponto de corte dos 35 anos, estava associado a uma taxa de detecção de 30% e a uma taxa de falsos positivos de 5%. Nos anos que se seguiram, sobretudo

nos países desenvolvidos, a primeira gravidez foi ocorrendo cada vez mais tarde, sendo que na actualidade cerca de 20% das mulheres grávidas têm mais de 35 anos, contendo cerca de 50% do número total de fetos com trissomia 21(153)(Ver 2.1.1.; Quadro 10.)

Se o risco das aneuploidias varia com a idade materna, existe também um risco de letalidade das aneuploidias com a idade gestacional (ver Quadro 11.): os fetos aneuploides têm uma maior probabilidade de morrerem *in útero* do que os fetos euploides e como tal o risco de aneuploidias ao nascimento diminui com a idade gestacional. A taxa de morte fetal entre as 12 semanas (quando o rastreio do primeiro trimestre é efectuado) e o termo da gravidez é de cerca de 30 a 40% para a trissomia 21 e de 80% para as trisomias 18 e 13. (Hecht and Hook, 1994; Halliday *et al.*, 1995; Snijders *et al.*, 1994, 1995, 1999; Morris *et al.*, 1999). Por outro lado, a taxa de morte fetal em fetos euploides é de apenas 1-2 %. O risco estimado para três trissomias fetais (21, 18 e 13) para uma mulher de 20 anos de idade, às 12 semanas de gestação, é de cerca de 1:1000, 1:2500 e 1:8000, respectivamente, e o risco dessas mulheres terem ao nascimento um bebé afectado é de 1:1500, 1:18000 e 1:42 000, respectivamente. Numa mulher com 35 anos de idade, os riscos respectivos, às 12 semanas, para estas aneuploidias são de 1:250, 1:600 e 1:1800, e os riscos ao nascimento são de 1:350, 1:4000 e 1:10 000 (Quadro 11.). Pelo que ficou dito é possível concluir que o risco individual basal depende da idade materna, e é diferente para cada idade gestacional diferente.

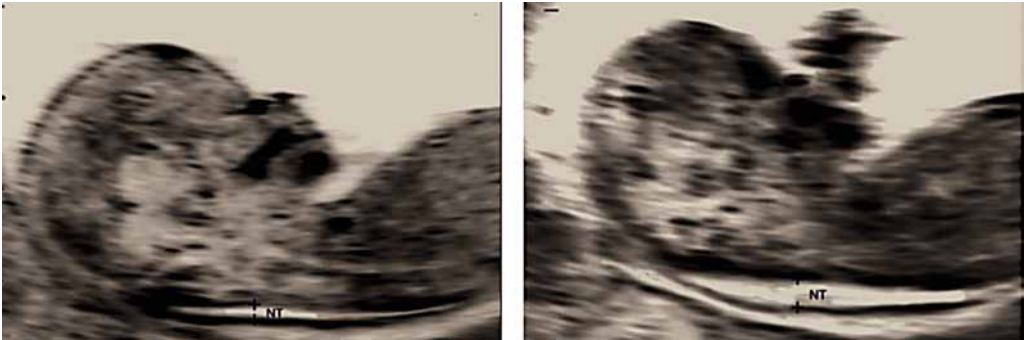
**Quadro 11. Risco estimado para as Trissomia 21, 18, 13 em relação à idade materna e gestacional (Adaptado (158))**

Idade Materna (anos)	Trissomia 21 Idade Gestacional (semanas)				Trissomia 18 Idade Gestacional (semanas)				Trissomia 13 Idade Gestacional (semanas)			
	12	16	20	40	12	16	20	40	12	16	20	40
20	1068	1200	1295	1527	2484	3590	4897	18013	7826	11042	14656	42423
25	946	1062	1147	1352	2200	3179	4336	15951	6930	9778	12978	37567
30	626	703	759	895	1456	2103	2869	10554	4585	6470	8587	24856
31	543	610	658	776	1263	1825	2490	9160	3980	5615	7453	21573
32	461	518	559	659	1072	1549	2114	7775	3378	4766	6326	18311
33	383	430	464	547	891	1287	1755	6458	2806	3959	5254	15209
34	312	350	378	446	725	1047	1429	5256	2284	3222	4277	12380
35	249	280	302	356	580	837	1142	4202	1826	2576	3419	9876
36	196	220	238	280	456	659	899	3307	1437	2027	2691	7788
37	152	171	185	218	354	512	698	2569	1116	1575	2090	6050
38	117	131	142	167	272	393	537	1974	858	1210	1606	4650
39	89	100	108	128	208	300	409	1505	654	922	1224	3344
40	68	76	82	97	157	227	310	1139	495	698	927	2683
41	51	57	62	73	118	171	233	858	373	526	698	2020
42	38	43	46	55	89	128	175	644	280	395	524	1516

Adaptado de “The 11-13(+6) weeks scan” de Kypros Nicolaides, FMF-London 1999 (158)

O síndrome de Turner (XO), cuja incidência não está relacionado com a idade materna, apresenta uma prevalência de cerca de 1:1500 às 12 semanas e de 1:4000 às 40 semanas. Nas restantes aneuploidias (também associadas aos cromossomas sexuais - 47,XXX, 47,XXY e 47,XYY) a incidência também não está relacionada idade materna e uma vez que a taxa de morte fetal *in útero* não é superior à dos fetos euplóides, a prevalência global (de cerca de 1 em 500) não diminui com a idade gestacional. A triploidia também não está relacionada com a idade materna e a prevalência é de cerca 1:2000 às 12 semanas, mas é raramente observada em nados vivos porque a maioria do feto tende a morrer às 20 semanas (153).

**2.1.2.2.4 Translucência da Nuca (TN)** corresponde à medição da imagem ecográfica do espaço por detrás da nuca do feto, que apresenta uma acumulação de líquido subcutânea. A sua pesquisa deve ser efectuada no 1º trimestre, entre as 11 e as 13 semanas + 6 dias de idade gestacional, utilizando uma sonda transabdominal ou transvaginal, numa altura em que o comprimento crâneo-caudal (CCC) se encontre entre um mínimo de 45 mm e um máximo de 84 mm. A TN do feto aumenta com o CCC, pelo que é essencial levar em conta a idade gestacional inferida do CCC, quando se observa um aumento da TN(153). Uma TN aumentada está associada com a trissomia 21, síndrome de Turner e outros defeitos cromossómicos, assim com a outras malformações fetais (cardiopatias congénitas) e síndromes genéticas(142) (ver também 2.4.4.2.). Um valor de TN  $\geq$  a 3 mm é considerado um forte preditor de defeitos cromossómicos(154) (Figura 3.)(ver adiante em 2.2.).



a)

b)

**Figura 3. a)** Espessura normal da TN; **b)** Espessura aumentada da TN

(Adaptado de (158))

**2.1.2.2.5 Rastreio combinado do primeiro trimestre** resulta da combinação da medição de TN e do CCC, ambos medidos entre as 11<sup>+0</sup> e as 13<sup>+6</sup> semanas de gravidez, com a colheita de amostra de sangue periférico materno, para a obtenção da concentração da proteína-A plasmática associada à gravidez (PAPP-A), e da fracção  $\beta$  livre da gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG livre). Todos estes parâmetros, juntamente com a idade materna, idade gestacional e alguns outros factores de correcção que serão descritos adiante, são usados para estimar as probabilidades de que o feto esteja afectado com uma aneuploidia(133,140,145).

**2.1.2.2.6 O Teste Triplo** surgiu depois das associações encontradas entre alguns marcadores séricos e o SD, no segundo trimestre da gravidez. A primeira associação surgiu com valores baixos da concentração sérica de  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) (Merkatz *et al.*, 1984), que levaram à utilização deste marcador, associado à idade materna, como teste de rastreio com um marcador único (Cuckle *et al.*, 1984, 1987). Posteriormente, a associação de níveis séricos elevados de  $\beta$ -hCG total e SD, levaram ao aparecimento do teste duplo (AFP e  $\beta$ -hCG total). O 3º marcador encontrado com associação ao SD foi o estriol não-conjugado (uE3), que se encontrou em baixas concentrações em gravidezes afectadas (Canick *et al.*, 1988). Deste modo, durante os anos 80 do século passado a principal ferramenta utilizada para o rastreio do SD foi o chamado teste triplo, cujo uso se prolongou ainda aos dias de hoje (Wald *et al.*, 1988)(145). Este é um teste sérico do 2º trimestre, obtido entre a 15ª e a 20ª semana de gestação, baseado na medição das concentrações séricas de AFP,  $\beta$ -hCG total e uE3, que juntamente com a idade materna e a idade gestacional, são usados para calcular o risco de aneuploidias e de defeitos de tubo neural (DTN), no feto(133).

**2.1.2.2.7 Teste Quadrúplo** Este é também um teste de 2º trimestre. Resulta da adição ao teste triplo de mais um marcador sérico, a inibina-A, que é referido ser encontrada em níveis séricos elevados em gravidezes afectadas com SD (van Lith *et al.*, 1992; Wald *et al.*, 1999a) (145). Deste modo, a resultante é um teste sérico que é avaliado no 2º trimestre de gravidez e é baseado na medição de AFP, uE3,  $\beta$ -hCG total (ou  $\beta$ -hCG livre), e inibina-A juntamente com a idade materna e a idade gestacional, para avaliar o risco de aneuploidias e DTN(133).

**2.1.2.2.8 Teste Sérico Integrado** é executado em duas fases. Na primeira fase, por volta das 11 semanas de gravidez, é determinada a concentração sérica da PAPP-A. O segundo estadio, envolve uma segunda colheita de sangue, idealmente colhida entre as 15 ou 16 semanas de gravidez. Esta segunda amostra de sangue mede níveis séricos de 4 parâmetros bioquímicos – AFP, uE3, free  $\beta$ -hCG e inibina-A. A medição destes 5 marcadores juntamente com a idade materna e a idade gestacional são usados para a estimativa das probabilidades do feto ser portador de aneuploidias ou DTN(133,145).

**2.1.2.2.9 Teste Integrado** resulta da integração dos marcadores de rastreio do primeiro e do segundo trimestre por forma a obter apenas um único risco, que resultou na assunção do uso de cada um destes marcadores no seu período óptimo, ou seja, quando a diferença entre os casos de SD e casos controlos é maior. O teste integrado combina a medição ecográfica da TN e o doseamento no soro dos níveis de PAPP-A, no primeiro trimestre, com a determinação no soro dos parâmetros do segundo trimestre (AFP,  $\beta$ -hCG, E3 e inibina) (teste quádruplo)(145). Este teste é realizado em duas etapas. Na primeira fase, às 11 semanas de gravidez, é retirada

uma amostras de sangue materno para determinar a concentração sérica PAPP-A, e no mesmo período, a idade gestacional e a TN são determinados ecograficamente. A segunda etapa envolve uma nova amostra de sangue, idealmente colhida entre as 15 ou 16 semanas de gravidez. Somente depois desta segunda fase é que um resultado estatístico é fornecido ao casal(133).

Este teste integrado apresenta elevadas taxas de detecção e baixas taxas de falsos positivos, mas a grande desvantagem é que o teste não pode ser finalizado até as determinações do 2º trimestre estarem completas(140)(Figura 4. e Quadro 12.).

**Figura 4.** Evolução histórica do rastreio pré-natal para despiste das aneuploidias

<b>1970:</b> Rastreio baseado apenas na idade materna (>40) ou história de gravidez anterior afectada
<b>1984:</b> AFP foi adicionada (níveis baixos, risco aumentado)
<b>1988:</b> Teste de Rastreio do 2º Trimestre (15-20 sem)
▶ <b>Teste Triplo</b> (AFP, hCG Total e uE3)
<b>1990:</b> Introdução Rastreio 1º trimestre (11-13 sem+6d)
<b>1995:</b> <b>Introdução do Rastreio Combinado do 1º Trimestre</b>
▶ <b>Idade Materna, NT, β-hCG livre, PAPP-A</b>
<b>1996:</b> A inibina-A foi adicionada ao Teste de Rastreio de 2º Trimestre
▶ <b>O Teste Quádruplo</b> (AFP, hCG Total, uE3, inibin-A)
<b>1999:</b> Teste de Rastreio Integrado
▶ <b>Marcadores 1º Trimestre (bioquímicos e ecog): 10-13 sem</b>
▶ <b>Marcadores 2º Trimestre: 15-20 sem</b>

**Quadro 12.** Comparação entre a taxa de detecção, para uma taxa de falso positivo de 5%, de diferentes métodos de rastreio da trissomia 21.

<b>Método de rastreamento</b>	<b>TD (%)</b>
Idade materna (IM)	30
IM e bioquímica sérica materna entre 15–18 semanas	50–70
IM e TN entre 11–13 <sup>+6</sup> semanas	70–80
IM e TN e dosagem sérica materna da fração livre do β-hCG e PAPP-A entre 11–13 <sup>+6</sup> semanas	85-90
IM e TN e osso nasal fetal (ON) entre 11–13 <sup>+6</sup> semanas	90
IM e TN e ON e dosagem sérica materna da fração livre do β-hCG e PAPP-A entre 11–13 <sup>+6</sup> semanas	95

*hCG: gonadotropina coriônica humana, PAPP-A: proteína plasmática A associada a gestação. (Adaptado de (198))*

### 2.1.2.3 Definições de diagnóstico pré-natal

O resultados dos testes não invasivos pode ser de dois tipos, classificado como de “baixo risco” / “sem risco acrescido” ou de “alto risco” / “risco acrescido”. Um resultado “baixo risco” significa que o risco que a grávida tem de ter um feto com síndrome de Down é menor do que o ponto de corte determinado; um resultado “alto risco” significa que o risco de síndrome de Down é igual ou superior ao do ponto de corte. À grávida que possui um resultado “alto risco” é oferecido a possibilidade do teste diagnóstico, quer seja a biópsia das vilosidades coriônicas (BVC), quer seja a amniocentese(140), que são as possibilidades disponíveis de testes diagnósticos<sup>8</sup>. Ambos permitem a colheita de células fetais para o estudo citogenético do cariótipo. A BVC tem a vantagem de poder ser executado mais precocemente na gravidez (no primeiro trimestre, entre a 10ª e a 13ª semana de gestação), estando associado a um risco de 0,5-1% de perda fetal. A amniocentese não pode ser executado antes das 16 semanas completas de gestação e também está associado a um risco de perda fetal de 0,5-1%.

**O diagnóstico pré-natal** é definido como o diagnóstico feito num feto vivo e em qualquer idade gestacional, implicando um processo analítico laboratorial que permita a obtenção de um resultado final e exacto, da eventual presença de anomalias cromossómicas. Para obter uma amostra de DNA fetal que permita o diagnóstico, são usados procedimentos invasivos como a BVC e a amniocentese. Estes procedimentos, como também já se referiu, estão associados a um risco de perda de fetal de cerca de 0,5-1%, estando deste modo só preconizados em gravidezes consideradas de risco elevado para aneuploidias, quer seja decorrente de rastreio pré-natal, de história pessoal ou gravidez anterior ou decorrente de anomalia morfológica despistada por ecografia(132,133).

**2.1.2.3.1 Biópsia das vilosidades coriônicas (BVC)** é um procedimento que envolve a aspiração de tecido trofoblástico, sob o controlo ecográfico, transabdominal ou transcervical, depois de completadas as 11 semanas de gestação, para a obtenção de uma amostra de células fetais(133).

**2.1.2.3.2 Amniocentese** é um procedimento invasivo que é efectuado a partir das 16 semanas completas com objectivo de se obter uma amostra de células fetais a partir do líquido amniótico. A amostra de líquido amniótico é aspirada e enviada para análise de anomalias cromossómicas e genéticas(133).

---

8. Ainda existe a possibilidade da Cordocentese, outro método invasivo de obtenção de células fetais, pouco usada na actualidade. Só pode ser efectuada após as 20 semanas de gestação e apresenta um risco de aborto de 2%.

Em resumo, os teste não invasivos utilizados correntemente como testes de rastreio, apresentam taxas de detecção de 90–95% e taxas de falsos positivos de 3–5%, mas todas as possíveis combinações devem ser seguidas de testes diagnósticos, caso o resultado do teste de rastreio seja um “alto risco”(140,153,155).

## 2.2 CONTEXTO HISTÓRICO DO RASTREIO PRÉ-NATAL E DIAGNÓSTICO DE ANEUPLOIDIAS

O rastreio de rotina, na medicina reprodutiva moderna, foi iniciado para a pesquisa de defeitos do tubo neural (DTN) (Wald *et al.*, 1977). Enquanto que a pesquisa de defeitos do tubo neural se tem mantido relativamente inalterada (apesar de depender hoje em dia mais da qualidade da ecografia do que do laboratório), durante as últimas três décadas o rastreio do SD evoluiu substancialmente, tendo sido muito frequentemente matéria de debate na política de saúde. Penrose LS (Lionel Sharples Penrose, 1898-1972, geneticista) em artigo publicado em 1993 no *Journal of Genetics*, é o primeiro a estabelecer uma associação entre a idade materna e o risco de uma gravidez com um feto portador de síndrome de Down.

No entanto, foi apenas em 1959 que Lejeune, Turpin e Gautier identificaram a presença de um cromossoma 21 extra como aspecto patognomónico do síndrome de Down. O primeiro relato de uma análise cromossómica bem sucedida às células do líquido amniótico data de 1966, tendo o primeiro diagnóstico antenatal de síndrome de Down sido efectuado em 1968. A partir dos anos 70 do século passado foi gradualmente aplicado o primeiro método de rastreio da trissomia 21, baseada na idade avançada ou na história prévia de anomalias cromossómicas, para o diagnóstico por amniocentese. Por razões financeiras, o diagnóstico pré-natal não podia ser oferecido a todas as mulheres grávidas, estando inicialmente disponível para mulheres com 40 ou mais anos ou com história de uma filho previamente afectado e não para a totalidade da população grávida. À medida que o procedimento foi considerado mais seguro e mais fácil de ser aplicado de modo mais generalizado, o grupo de risco foi redefinido de modo a incluir as mulheres com 35 ou mais anos. A amniocentese era executada entre 16 e as 18 semanas de gestação, mas apenas abrangia 5% das mulheres grávidas, identificando 30% das gravidezes com síndrome de Down. Esta estratégia de rastreio poderia potencialmente detectar 100% dos casos de trissomia 21, mas apenas neste grupo acima dos 35 anos, o que implica que 70% dos casos de trissomia 21 não eram detectados(142,156,157).

Em 1972 verificou-se existir uma associação entre o aumento da concentração de  $\alpha$ -feto-proteína (AFP) no líquido amniótico e a presença de gravidezes com defeitos do tubo neural (DTN).

Mais tarde, os níveis aumentados de AFP foram também associados a casos de anencefalia. Este suporte científico permitiu a introdução no Reino Unido, a partir de 1977, do primeiro programa de rastreio pré-natal sérico para o despiste de defeitos congénitos. Uma nova utilização para a determinação sérica de AFP surgiu em 1984 com Merkatz e Cuckle, que descrevem que a AFP, determinada no 2º trimestre, apresenta valores cerca de 25% mais baixos nas gravidezes com Down do que nas gravidezes não afectadas, e que como tal se associa a um risco aumentado de síndrome de Down(164). Esta associação provou-se independente da idade materna, pelo que ambos os dados podiam ser combinados para a obtenção do risco de síndrome de Down na gravidez, com uma taxa de detecção de 35%, mantendo 5% de taxa de falsos positivos(137,145).

Vários marcadores séricos bioquímicos foram investigados ao longo dos anos, mas o rastreio de rotina passou a basear-se na utilização da combinação de dois, três ou quatro marcadores. Nos anos 80 do século passado foi introduzida uma nova metodologia de rastreio que não só levava em linha de conta a idade materna, mas também a concentração de vários produtos fetoplacentários na circulação periférica materna. Diferentes combinações das proteínas séricas  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), estriol não-conjugado (uE3), gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG) (fracção total e livre) e inibin-A, quando aplicadas no despiste das gravidezes com trissomia 21, por apresentarem medianas das concentrações séricas maternas suficientemente diferentes do normal, permitiam a detecção dos grupos de risco. Estas metodologias de despiste eram mais eficientes do que a idade materna individualmente, detectando cerca de 50% a 70% dos fetos com trissomia 21 para a mesma taxa de testes invasivos (cerca 5%)(142,157).

Dois dos marcadores, a  $\beta$ -hCG e o uE3, juntos com a AFP e idade materna, formaram a base do “teste triplo”. Este “teste triplo” era executado entre as 15 e a 20 semanas de gravidez e identificava cerca de 60% das gravidezes com síndrome de Down, mantendo a taxa de falsos-positivos de 5%. À época este era o método de rastreio mais eficiente baseado na informação disponível e mais equitativo, assegurando que às mulher com risco mais elevados era oferecido a amniocentese. O “teste quádruplo”, incluindo a quantificação de AFP,  $\beta$ -hCG (total ou livre), E3 e inibina-A, aumentou as taxas de detecção do SD para cerca de 76%, isto com uma taxa de falsos positivos de 5%(156).

Nas décadas de 1970 e 80 o rastreio pré-natal tornou-se parte integrante da prática obstétrica em muitos países desenvolvidos, principalmente através do uso da bioquímica sérica materna no 2º trimestre(137).

Em 1991 descreveu-se pela primeira vez a associação entre valores baixos das concentrações séricas da proteína-A plasmática associada à gravidez (PAPP-A), e as gravidezes portadoras de síndrome de Down, antes das 15 semanas de gestação, por sua vez associadas à presença de níveis séricos elevados de  $\beta$ -hCG livre. Estes dois marcadores séricos, quando combinados com a idade materna, permitiam uma taxa de detecção de 62% (para a mesma taxa de falsos positivos de 5%).

Entre 1985 e 1992, o rastreio ecográfico para o síndrome de Down foi introduzido em alguns centros no Reino Unido. O marcador ecográfico mais significativo nas gravidezes com síndrome de Down foi descrito como um espaço alargado, localizado na parte de trás da nuca fetal, entre a coluna vertebral e a pele, que levou à introdução do conceito de translucência da nuca. Em 1992, KH Nicolaidis, num artigo publicado no BMJ(154) mostrou o potencial desta medição no rastreio para o síndrome de Down, no primeiro trimestre. Nesse estudo a presença da translucência da nuca estava associada a um aumento superior a 10 vezes de risco de anomalias cromossómicas, verificando-se a existência de uma correlação positiva entre risco e aumento da espessura da translucência(154)(Figura 3. e 4.)(ver Quadro 13.)

**Quadro 13. Relação entre a TN fetal e o cariótipo anormal em 827 gestações de baixo risco, às 10-14 semanas**

Espessura da Nuca (mm)	Nº de fetos	Cariótipo anormal							
		Nº e % de fetos	T13	T18	T21	T22	47,XXY	47,XXX	Mosaico
<1	724	10 (1)		1	3		2	1	3
1-2	52	0							
3	28	4 (14)	1		1	1	1		
4	12	6 (50)	1	1	4				
5	6	4 (67)			4				
6	2	1 (50)		1					
7	2	2 (100)		2					
8	1	1 (100)			1				

(Adaptado de (154))

Na década 90 houve um movimento significativo de mudança do rastreio das aneuploidias do segundo para o primeiro trimestre, mudança que permitiu, por um lado, uma securização mais precoce para as mães cujas gravidezes não apresentavam riscos, e interrupções médicas da gravidez num período mais precoce da gravidez, para as gravidezes com aneuploidias confirmadas. Este rastreio, agora transportado para o primeiro trimestre, prometia uma me-

lhoria das taxas de detecção, com manutenção de baixas taxas de falsos positivos(156). Nesta década, o rastreio pela combinação da idade materna com a medição da TN entre as 11<sup>+0</sup> e as 13<sup>+6</sup> semanas tornou possível identificar cerca de 75% dos fetos com aneuploidias (para 5% de TFP)(142).

Subsequentemente, a idade materna e a TN foram combinados com marcadores bioquímicos no soro materno (fração livre  $\beta$ -hCG e PAPP-A), no primeiro trimestre, identificando 85% a 90% dos fetos com trissomia 21. Para além disso, o desenvolvimento de novos métodos laboratoriais, que permitem a obtenção destes marcadores em 30 minutos, tornou possível a introdução do conceito OSCAR (clínica *One-Stop* para avaliação de risco), que visava a avaliação do risco para trissomia 21 (com base na idade materna, TN e marcadores bioquímicos) numa única visita.

Em 2001, verificou-se que em 60-70% dos fetos com trissomia 21 não era possível observar o osso nasal, no 1º trimestre. Esse achado ecográfico permitiu aumentar a taxa de detecção para mais de 95%(158). Nos últimos 10 anos, outros marcadores ecográficos do primeiro trimestre foram descritos e adicionados por forma a melhorar a taxa de detecção das aneuploidias e reduzir a taxa de falsos positivos (eg, osso nasal, ângulo facial, regurgitação da tricúspide e fluxo do *ductus venosus*)(153). Para o diagnóstico pré-natal do síndrome de Down as mulheres ainda devem, no entanto, ser submetidas a testes invasivos. Embora a biópsia das vilosidades coriônicas e a amniocentese apresentem apenas um pequeno risco de perda de gravidez, o teste pré-natal ideal para o síndrome de Down não apresentaria qualquer risco para a gravidez de uma mulher, deveria detectar 100% dos casos de trissomia 21 no início da gravidez, sem quaisquer resultados falso-positivos(156)(ver 2.5.).

### **2.2.1 Recomendações oficiais**

Enquanto que o método original, oferecido apenas a 5% das grávidas, envolvia testes invasivos e identificava menos de 30% dos fetos com SD, os novos testes que incorporam a ecografia e bioquímica do soro materno, permitiram melhorar as taxas de detecção e reduzir o número de procedimentos invasivos desnecessários. Actualmente, e apesar de já existirem desde de finais de 2011 recomendações nacionais da DGS, a aplicação na prática clínica ainda envolve tanto os testes do 2º trimestre como os do 1º trimestre, a integração de marcadores do 1º e 2º trimestre(145) (Quadro 14.), ou a execução de testes invasivos (amniocentese), a todas as grávidas acima dos 35 anos.

**Quadro 14. Desempenho dos diferentes métodos de rastreio para a trissomia 21**

Método de rastreio	Taxa de detecção (%)	Taxa de Falsos Positivos (%)
IM	30	5
<b>1º Trimestre</b>		
IM + TN fetal	75-80	5
IM + $\beta$ -hCG livre e PAPP-A soro	60-70	5
IM + TN+ $\beta$ -hCG livre e PAPP-A soro (Combinado)	85-95	5
Combinado + ON ou v. tricúspide ou DV	93-96	2.5
<b>2º Trimestre</b>		
MA + serum AFP, hCG (teste duplo)	55-60	5
MA + serum AFP, $\beta$ -hCG livre (teste duplo)	60-65	5
MA + serum AFP, hCG, uE3 (teste triplo)	60-65	5
MA + serum AFP, $\beta$ -hCG livre, uE3 (teste triplo)	65-70	5
MA + serum AFP, hCG, uE3, inibina A (teste quadrúplo)	65-70	5
MA + serum AFP, $\beta$ -hCG livre, uE3, inibina A (teste quadrúplo)	70-75	5
IM + TN + PAPP-A (11–13 weeks) + teste quadrúplo	90-94	5

IM (*idade materna*); TN (*Translúcência da Nuca*); -hCG (*fracção da gonadotrofina humana coriónica*); PAPP-A (*proteína plasmática associada à gravidez-A*) (*Adaptado de (153)*)

Noutros países da Europa existem igualmente recomendações nesta área, nomeadamente as do “NICE-UK” (National Institute for Health and Clinical Excellence) (CG62 Antenatal Care,(149,159)), que são muito claras no estabelecimento de normativas para o rastreio do Síndrome de Down: de acordo com a última revisão de 2011, deve ser oferecido um rastreio para o síndrome de Down a todas as mulheres, utilizando um teste com taxa de detecção superior a 75% e taxa de falsos positivos inferior a 3%; estas medidas de desempenho devem ser padronizadas e baseadas num ponto de corte de 1/250, a termo. O rastreio deve ser feito no primeiro trimestre, mas devem ser permitidos rastreios tardios (que podem ocorrer até às 20 semanas+0 dias) para as grávidas que acorram tardiamente. Deve ser oferecido, para o rastreio do síndrome de Down, o “teste combinado”, entre as 11<sup>+0</sup> dias e as 13<sup>+6</sup> semanas. Para as grávidas que entrem tarde no processo de acompanhamento, deve ser oferecido o teste de rastreio triplo ou quadrúplo entre as 15 e as 20 semanas.

As recomendações do “NSC-UK” (*National Screening Committee UK - Fetal Anomaly Screening Programme for Down’s Syndrome: Policy recommendations 2007–2010: Model of Best Practice*) (160) refere a necessidade de utilização de programas de rastreio com uma taxa de detecção superior a 90% das gravidezes afectadas, para uma taxa de falsos positivos inferior a 2%. Estas medidas de desempenho são padronizadas e baseadas num ponto de corte de 1/150, a termo. O NSC UK recomenda que o rastreio se faça entre as 10+0 semanas até às 20+0 semanas de gestação, usando uma das estratégias recomendadas: a preferida é a do rastreio combinado do 1º trimestre, importante ferramenta do diagnóstico prenatal, a qual pode ficar completa numa única consulta, permitindo assim a obtenção do risco antes das 14 semanas.

A Direcção Geral de Saúde, na Norma 023/2011(161), elaborada pela Comissão Técnica Nacional de Diagnóstico Pré-natal e revista em 21/5/2013(162), sobre exames ecográficos na gravidez de baixo risco, refere no ponto II C) que “...a quantificação do risco de trissomia 21 deve ser baseada na medida da translucência da nuca e na idade materna, usando para este fim uma base de dados informatizada, tal como previsto no ponto 5, alínea a) subalínea iv e alínea b) subalínea iv. Sempre que possível, deve ser realizada em combinação com a determinação da fracção livre da gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG livre) e da proteína A plasmática associada à gravidez (PAPP-A). O resultado deste rastreio deve ser global, integrando todos os parâmetros avaliados”. No ponto IV D) refere-se “que o cumprimento dos critérios referidos na presente Norma é considerado como condição indispensável para reduzir o número de técnicas invasivas desnecessárias e atingir resultados significativos na aplicação do rastreio pré-natal de trissomia 21, nomeadamente taxas de detecção de 80%, com 5% de falsos positivos”.

A associação da medição da translucência da nuca e dos parâmetros bioquímicos ( $\beta$ -hCG livre, e PAPP-A) aumenta a taxa de detecção para 85-95%, com 5% de falsos positivos. Para que estes requisitos de desempenho sejam obtidos, foi estabelecido, em Portugal, o ponto de corte consensual de 1/300.

### 2.3 FUNDAMENTAÇÃO DO RASTREIO PRÉ-NATAL PARA DESPISTE DAS ANEUPLOIDIAS

As aneuploidias são das principais causas de morte perinatal e de deficiência na infância. No período pré-natal, em que já é impossível evitar a presença das malformações congénitas e dos defeitos de nascença, é apesar disso possível efectuar a sua detecção precoce, instituindo-se um programa de apoio emocional e preparação psicológica para os progenitores. Consequentemente, a detecção das aneuploidias cromossómicas constitui a indicação mais frequente para diagnóstico pré-natal invasivo. No entanto, os testes invasivos, quer seja por amniocentese ou biópsia das vilosidades coriónicas (BVC), estão associados a um risco de perda fetal, devendo só ser realizados em gestações consideradas de alto risco para aneuploidias(153). O rastreio pré-natal oferece a possibilidade de prevenir o nascimento de crianças com anomalias congénitas graves. Há diferentes métodos de rastreio (Quadro 14.) e o método de escolha deverá ser o que maximiza a taxa de detecção para uma determinada taxa de falso-positivos(157). O rastreio não vai seleccionar todas as gestações afetadas (resultados falso-negativos) e poderá identificar algumas das gestações não afetadas como resultados positivos (resultados falso-positivos). A operação básica de um rastreio é, conforme definido por Wald, uma separação de uma dada população em dois grupos: um grupo com um baixo risco de ser afetado pela patologia em causa e outro com risco suficientemente elevado para justificar exames diagnósticos(163). Assim, no rastreio do SD, vários marcadores são avaliados em conjunto: é ineficaz considerar estes testes individualmente, ou sequer sequencialmente, porque isso significará que mais mulheres sofreram procedimentos invasivos diagnósticos para identificar o mesmo número de gestações afetadas(157).

O objectivo final do rastreio é apurar o risco individual da grávida ser portadora de um feto com anomalias cromossómicas, para além do risco associado à idade materna (risco *à priori* ou risco basal): baseado nesta informação, os teste invasivos podem ser oferecidos para determinar o cariótipo fetal. Presentemente os testes invasivos ainda constituem o teste definitivo de aneuploidias fetais. Deste modo, os programas de rastreio e diagnóstico pré-natal permitem aos casais decidirem, informadamente, sobre as suas opções reprodutivas [Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 1997](137). O rastreio do primeiro trimestre permite não só uma securização precoce, como a tomada de decisão sobre uma eventual interrupção da gravidez, que pode ser realizada antes dos movimentos fetais serem sentidos, num período com menores implicações para a saúde materna. Para além destes benefícios, podemos ainda considerar outras vantagens do exame ecográfico entre 11<sup>+0</sup> e as 13<sup>+6</sup> semanas: confirmação da

gravidez, confirmação da viabilidade fetal, datação exacta da gravidez, detecção de gravidezes múltiplas, corionicidade e amniocidade, diagnóstico precoce das principais malformações fetais (acrania, megabexiga, defeitos da parede abdominal)(142,152). O argumento de que algumas das trissomias detectadas no primeiro trimestre seriam reduzidas espontaneamente antes do termo da gravidez, não constitui argumento contra a aplicação do rastreio combinado no 1º trimestre. Para estas mulheres, as informações obtidas precocemente são importantes, permitindo decisões reprodutivas futuras e prevenindo interrupções tardias(137).

As desvantagens da abordagem através dos trimestres, no caso dos rastreios integrado sérico e integrado combinado com ecografia, são: em primeiro lugar, o seu fraco desempenho em comparação com uma abordagem combinada do primeiro trimestre (sobretudo quando este incorpora os novos marcadores ecográficos); em segundo lugar, o adiamento da tranquilização dos pais, que se pode prolongar por várias semanas; em terceiro lugar, a possibilidade de privar a mulher de optar por uma interrupção no caso de confirmação de existência de problema; em quarto lugar, o facto de muitas mulheres que não concluem o teste nos dois trimestres ficarem privadas do rastreio(153).

### **2.3.1 Requisitos básicos para um programa de rastreio organizado**

Os programas de rastreio organizado devem abranger patologias conhecidas e bem definidas, com uma prevalência bem conhecida, tal como as aneuploidias. Estas são patologias medicamente importantes para os quais existe uma possível atitude médica eficaz, que é geralmente acordada e aceitável tanto para a especialistas e autoridades como também para os casais. Todos os procedimentos, tendo em consideração as complicações a longo prazo, devem ser eficientes e as instalações disponíveis ou fáceis de instalar. O teste de rastreio deve ser simples e seguro, com distribuição das variáveis bem caracterizada, em indivíduos afetados e não afetados, com sobreposição suficientemente pequena. É possível definir um ponto de corte adequado. Por último, mas não menos importante, todas as pessoas que podem beneficiar deste teste de rastreio devem ter acesso a ele(157).

## **2.4 RASTREIO PRÉ-NATAL COMBINADO DO PRIMEIRO TRIMESTRE**

Um programa de rastreio eficiente só pode ser alcançado através da combinação de informações provenientes de mais de que um marcador(137), porque infelizmente, nenhum marcador, *de per si*, tem poder discriminatório suficiente para separar as populações afetadas

das não afetadas. O método de rastreio pré-natal mais utilizado na actualidade é o rastreio combinado do primeiro trimestre onde se conjugam, num software computacional, a informação obtida na determinação dos parâmetros bioquímicos ( $\beta$ -hCG livre e PAPP-A) com a TN, a idade gestacional obtida pelo CCC e a idade materna, para efectuar o cálculo do risco das aneuploidias. Não existe nenhuma associação significativa entre TN fetal e a  $\beta$ -hCG livre ou a PAPP-A, no soro materno, tanto na trissomia 21 como nas gravidezes euplóides. Deste modo, os marcadores ecográficos e os marcadores bioquímicos podem ser combinados para fornecer um rastreio mais eficaz do que qualquer deles usado individualmente (Brizot et al., 1994, 1995; Nobre et al., 1995; Spencer et al., 1999). Muitos estudos intervencionais prospectivos envolvendo milhares de mulheres grávidas, evidenciaram que para a mesma taxa de falsos-positivos de 5%, o teste combinado do primeiro trimestre identifica cerca de 90% das gestações com trissomia 21 (Krantz et al., 2000; Alana et al., 2002; Schuchter et al., 2002; Spencer et al., 2003c; Wapner et al., 2003; Nicolaides et al., 2005; Ekelund et al., 2008; Kagan et al., 2009a; Leung et al., 2009)(153). Na prática, esta taxa de detecção não pode ser alcançada pela bioquímica ou pela TN fetal individualmente, mas pode ser conseguida pela combinação de ambos(137). Além de detectar 90% dos casos com trissomia 21, verificou-se também que outras anomalias cromossómicas podem ser identificadas, se considerarmos um adicional de falsos positivos: o uso do algoritmo para trissomia 21 também identifica cerca de 75% dos fetos com trissomias 18 e 13. O uso combinado do algoritmo para trissomia 21 com algoritmos específicos para trissomias 18 e 13, melhora a detecção destas aneuploidias para 95%, com um pequeno aumento na taxa de falso-positivos em cerca de 0,1%. Uma outra consequência benéfica da utilização dos três algoritmos combinados é a identificação precoce de cerca de 85% dos fetos com triploidia(153).

#### 2.4.1 Aspectos éticos

Na prática médica em geral, os estudos preditivos ou preventivos, com última finalidade diagnóstica, encontram justificação se estiverem disponíveis recursos que permitam intervir a nível terapêutico. Existe uma obrigação de não iniciar qualquer acção, excepto se as consequências da mesma estiverem quantificadas, sejam previsíveis e exista uma terapêutica eficaz(157). É essencial que o casal possa fazer uma escolha informada, antes de decidir participar no rastreio. Na presença de um resultado de “alto risco ou risco acrescido”, é necessário que seja oferecido aconselhamento acerca da condição em causa e acerca dos procedimentos que se seguem e dos respectivos riscos.

## 2.4.2 A contribuição da Fetal Medicine Foundation (FMF)

A FMF desenvolveu um processo de certificação introduzindo a formação, suporte e auditoria para a adequada implementação de muitos aspectos da medicina fetal e especificamente para a medição da TN fetal. Tal como acontece com a introdução de qualquer nova tecnologia na prática clínica, é essencial que a medição da TN fetal e de outros marcadores ecográficos do primeiro trimestre seja adequadamente aprendida e treinada e que seus resultados sejam auditados.

Os certificados de competência FMF são atribuídos aos ecografistas que, tendo participado nos cursos teóricos, submeteram os seus conjuntos de imagens a esta centro. Deste modo, a FMF pretende estabelecer e manter elevados padrões de execução técnica, a nível internacional, através educação contínua e de auditorias e deste modo garantir que todos os que realizam este tipo de exame ecográfico tenham e continuem a receber a formação adequada. O certificado de competência para a ecografia das 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas é garantido a todos os profissionais que demonstrem elevados padrões de qualidade técnica, assim como um profundo conhecimento para o diagnóstico e manejo das condições identificadas no exame ecográfico(153). Se o profissional pretender fazer uso de marcadores ecográficos adicionais para a detecção de aneuploidias cromossômicas (eg, osso nasal, ângulo facial, fluxo tricúspide e fluxo ductus venoso), terá de proceder do mesmo modo e obter o certificado FMF através de treino, demonstração e evidência de capacidade técnica.

A FMF tem sido, desde a sua fundação, o mais forte motor da investigação clínica em medicina fetal. Nos últimos 10 a 20 anos, o rastreio combinado do primeiro trimestre tem tido uma grande implementação em todo o mundo, muito graças aos esforços FMF. Várias linhas de investigação têm sido desenvolvidas, resultando na individualização de importantes marcadores ecográficos (eg, osso nasal, o ângulo facial, o fluxo da válvula tricúspide, o fluxo do *ductus venosus*, o índice de pulsatilidade das artérias uterinas, o comprimento do colo) e bioquímicos (PAPP-A,  $\beta$ -hCG livre e PIGE, ou factor de crescimento placentário), os quais têm sido fundamentais na melhoria dos padrões de qualidade nesta área.

## 2.4.3 Resultados fetais adversos

O rastreio combinado do 1º trimestre (nomeadamente se acrescido de alguns marcadores ecográficos com o índice de pulsatilidade das artérias uterinas e o comprimentos do colo) e/ou um valor baixo de PAPP-A podem ser utilizados para estratificar as gestações como de alto ou baixo risco para alguns resultados fetais adversos, para além de síndrome de Down(164),

tais como o aborto espontâneo, a morte fetal, a morte neonatal e o parto pré-termo<sup>9</sup>, os quais podem ser antecipados desde o primeiro trimestre(165). O rastreio combinado do 1º trimestre, nomeadamente devido ao seu componente bioquímico PAPP-A, assume deste modo um potencial valor adicional no despiste destes resultados fetais adversos, desde que os defeitos de nascença<sup>10</sup> tenham sido excluídos(166,167).

Os obstetras estão cientes de que a exclusão das anomalias cromossómicas através do cariótipo, assim como a exclusão das anomalias estruturais óbvias resultante de ecografias detalhadas, não permitem excluir riscos de outros resultados adversos, em grávidas com resultados de risco acrescido, em rastreios combinados de primeiro trimestre e/ou baixas concentrações de PAPP-A. Para além dos resultados fetais adversos descritos, as alterações das concentrações séricas de  $\beta$ hCG livre e de PAPP-A são também preditivas de baixo peso ao nascer, restrição de crescimento fetal (RCF) e hipertensão induzida pela gravidez(168). A RCF, cuja incidência é cerca de 4 a 7%, constitui um problema clínico importante, estando associado a complicações como a morte fetal ou neonatal, morbidade a curto prazo (ou na vida adulta com obesidade e doença coronária), dismaturidade e defeitos físicos ou mentais temporários ou permanentes. Por este facto, torna-se relevante distinguir esta entidade de um feto constitucionalmente pequeno, mas saudável(169,170) ou na terminologia pediátrica, pequeno para idade gestacional (PIG)<sup>11</sup> (SGA do inglês: *small for gestational age*). Um feto com RCF significa que não atingiu o potencial geneticamente determinado para a sua idade gestacional(169,171). O recém-nascido pode ser pequeno quer por motivos constitucionais, quer devido a mudanças fisiopatológicas em factores maternos, placentares ou fetais: 70 % dos fetos PIG são pequenos simplesmente devido a factores constitucionais determinados por etnicidade, paridade, peso ou altura maternas, enquanto os restantes 30% são RCF(172,173). O rastreio da RCF é baseada no exame clínico e na identificação de potenciais factores de risco de origem materna, tais como gravidez prévia com RCF, pré-eclâmpsia, baixo peso pré-gravidez, baixo ganho de peso durante a gravidez índice(169), defeitos cromossómicos, tabagismo, doenças autoimunes reumáticas sistémicas, infecções, medicações várias, etc.

---

9. A perda da gravidez é definida como a falência espontânea da gravidez e inclui aborto espontâneo (definida como morte espontânea do feto e perda da gravidez até às 19 semanas e 6 dias de gestação) e morte fetal (definidas como nascimento de um feto morto às 20 semanas gestação e/ou com mais de 400 g de peso). Aborto é definido como a interrupção da gravidez às 12 semanas de gestação ou mais. Morte neonatal é definida como a morte de um nascituro nos primeiros 28 dias após o nascimento. Parto pré-termo é definido como o nascimento antes das 37, 34 ou 28 semanas completas de gestação.

10. Defeitos de nascença, cromossómicos ou não cromossómicos, anomalias estruturais ou funcionais que estão presentes na concepção ou ocorrem antes do fim da gravidez e que são diagnosticados até aos 6 anos de idade.

11. A definição preferida para pequeno para idade gestacional é: peso ao nascimento abaixo do percentil 10, ajustado para a idade gestacional.

O parto pré-termo é um dos resultados fetais adversos referidos, ocorrendo em cerca de 5% dos nascimentos nos países desenvolvidos, e em 25% nos países em vias de desenvolvimento(174). Os efeitos adversos decorrentes de parto prematuro impõem um fardo considerável, com risco acrescido de doença pulmonar crónica, lesão cerebral grave e sépsis neonatal. Outro resultado adverso referido é a perda fetal recorrente, que ocorre em aproximadamente 1% das mulheres, tendo sido sugerido que as causas autoimunes sejam um dos factores determinantes em alguns destes casos(103,124).

## **2.4.4 Parâmetros ecográficos**

### 2.4.4.1 Comprimento crâneo-caudal (CCC)

O comprimento crâneo-caudal (CCC) é a medida ecográfica obtida entre os dois polos do feto. Pode ser avaliada entre as 7 e as 13 semanas de gestação e é o método mais exacto para a determinação da idade gestacional, apresentando uma variação de 3-4 dias relativamente à data da última menstruação(175,176). O CCC deve estar situado entre 45 e 84 mm(153), para uma óptima medição da TN.

### 2.4.4.2 Translucência da nuca (TN)

Na década de 90 do século passado, o excesso de pele característico do SD foi associado à excessiva acumulação de líquido subcutâneo na região da nuca do feto, passível de visualização e identificado, através da ecografia do primeiro trimestre de gravidez, como um aumento de translucência da nuca (TN)(142). Vários estudos prospectivos intervencionais (ver Quadro 15.), em centenas de milhares de gravidezes, demonstraram que i) a TN fetal é medida com êxito em mais de 99% dos casos de trissomia 21, ii) o risco de anomalias cromossómicas aumenta com a idade materna e com a espessura da TN fetal e iii) nas gravidezes com TN baixa, o risco relacionado com a idade materna diminui(153). A TN fetal aumenta com o comprimento crâneo caudal (CCC), pelo que é essencial levar em conta a idade gestacional ao determinar uma espessura de TN aumentada.

**Quadro 15. Estudos prospectivos de rastreio da trissomia 21 pela medição da TN**

Study/year	Gestation (wk)	N	Successful measurement (%)	NT cut-off	False-positive rate(%)	Detection rate of trisomy 21(n/N)
Pandyaetal/1995 <sup>109</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	1,763	100.0	2.5 mm	3.4	3/4(75.0%)
Schwarzleretal/1999 <sup>110</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	4,523	100.0	2.5 mm	2.7	8/12(66.7%)
Schuchteretal/2001 <sup>111</sup>	10-12 <sup>+6</sup>	9,342	100.0	2.5 mm	2.1	11/19(57.9%)
Waydaetal/2001 <sup>112</sup>	10-13 <sup>+0</sup>	6,841	100.0	2.5 mm	4.1	17/17(100.0%)
Panburanaetal/2001 <sup>113</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	2,067	100.0	2.5 mm	2.9	2/2(100.0%)
Snijdersetal/1998 <sup>82</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	96,127	100.0	95th percentile	4.4	234/326(71.8%)
Theodoropoulosetal/1998 <sup>114</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	3,550	100.0	95th percentile	2.3	10/11(90.9%)
Zoppietal/2001 <sup>115</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	10,111	100.0	95th percentile	5.1	52/64(81.3%)
Gasiorek-Wiensesetal/2001 <sup>116</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	21,959	100.0	95th percentile	8.0	174/210(82.9%)
Brizotetal/2001 <sup>117</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	2,492	100.0	95th percentile	6.4	7/10(70.0%)
Comasetal/2002 <sup>43</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	7,345	100.0	95th percentile	4.9	38/38(100.0%)
Chasenetal/2003 <sup>118</sup>	11-13 <sup>+6</sup>	2,248	100.0	95th percentile	3.4	9/12(75.0%)
Szaboetal/1995 <sup>119</sup>	9-12 <sup>+6</sup>	3,380	100.0	3.0 mm	1.6	27/30(90.0%)
Taipaleetal/1997 <sup>120</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	6,939	98.6	3.0 mm	0.7	4/6(66.7%)
Pajkrtetetal/1998 <sup>121,122</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	3,614	100.0	3.0 mm	4.2	32/46(69.6%)
Audibertetal/2001 <sup>123</sup>	10-13 <sup>+6</sup>	4,130	95.5	3.0 mm	1.7	7/12(58.3%)
Rosenbergetal/2002 <sup>124</sup>	12-14 <sup>+0</sup>	6,234	98.6	3.0 mm	2.8	13/21(61.9%)
Economidesetal/1998 <sup>125</sup>	11-14 <sup>+6</sup>	2,256	100.0	99th percentile	0.4	6/8(75.0%)
Whitlowetal/1999 <sup>126</sup>	11-14 <sup>+6</sup>	5,947	100.0	99th percentile	0.7	15/23(65.2%)
<b>Total</b>		200,868	99.8		4.2	669/871(76.8%)

*In some of the studies, a cut-off in NT was used to define the screen-positive group; in other studies, the FMF software was used to estimate patient-specific risks that were based on maternal age, gestational age and fetal NT.*

*(Adaptado de (153))*

A idade gestacional óptima para a medição da TN situa-se entre as 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas de gestação; quando combinada com a idade materna(153), está reconhecida como um método eficaz de rastreio das principais trissomias(158). Se a TN for medida por ecografistas certificados, e se for combinada com a idade materna, são atingidas taxas de detecção da trissomia 21, 18 e 13 de 70– 75% (para 5%, ou menos, de falsos positivos)(153). A TN aumentada tem contribuído para o despiste das aneuploidias e mostrado ser, durante os últimos 20 anos, um

achado transversal a todo um conjunto de anomalias cromossômicas, síndromes genéticas, importantes defeitos cardíacos e de uma ampla gama de outras malformações fetais e displasias esqueléticas(177). No caso da medição da TN ser de  $\geq 3$ mm, e uma vez que a adição de outros parâmetros séricos não modifica o risco final de aneuploidias fetais, devem ser propostos testes adicionais (testes invasivos) para a elucidação daquele aumento(178).

#### 2.4.4.3 Marcadores ecográficos adicionais no primeiro trimestre

Para além da TN, existem os outros marcadores ecográficos do primeiro trimestre, altamente sensíveis e específicos para o despiste das anomalias cromossômicas: a ausência ou hipoplasia do osso nasal (ON), o aumento da impedância do *ductus venosus* (DV), a regurgitação da válvula tricúspide (RT) e o aumento do ângulo facial. As alterações no ON, DV e RT são observadas em 60, 66 and 55% dos fetos com trissomia 21 e em 2.5, 3.0 and 1.0%, respectivamente (Matias *et al.*, 1998; Cicero *et al.*, 2001, 2006; Huggon *et al.*, 2003; Nicolaidis, 2004; Faiola *et al.*, 2005; Falcon *et al.*, 2006; Kagan *et al.*, 2009b, 2009c; Maiz *et al.*, 2009) (Quadro 16.).

Como não existe nenhuma associação significativa entre o DV, ângulo facial, ON ou RT e os marcadores do rastreio combinado, estes marcadores podem ser incorporados no rastreio combinado do primeiro trimestre, desde que seja assegurada a correcta determinação de cada um, resultando numa melhoria do desempenho para uma taxa de detecção de 93 a 96% e uma diminuição na taxa de falsos-positivos para 2,5% (Kagan *et al.*, 2009b, 2009c; Maiz *et al.*, 2009). Do mesmo modo, conseguem-se idênticos desempenhos com uma política contingente: num primeiro estadio procede-se a todos os casos ao rastreio combinado do primeiro trimestre com idade materna, TN fetal,  $\beta$ -hCG livre e PAPP- A sérico. As gravidezes com risco de 1 em 100 ou mais, nesta primeira abordagem, são consideradas positivas e as que tiverem um risco superior a 1 em 1000 são consideradas negativas. Um risco entre 1 em 101 e 1 em 1000 constitui um risco intermédio, o que ocorrer em 15% do total das grávidas. Estas últimas devem prosseguir para um segundo estadio de rastreio com o osso nasal, *ductus venosus* e regurgitação da tricúspide, que vai modificar o risco obtido no primeiro estágio. O ponto de corte do risco ajustado neste segundo estadio é também de 1 em 100. Se o risco obtido for maior, as gravidezes são considerados positivas e aquelas com risco menor de 1 em cada 100 são negativas.

Um outro marcador ecográfico para o rastreio da trissomia 21, descrito mais recentemente (Bilardo *et al.*, 2010; Zvanca *et al.*, 2011), é o aumento do fluxo da artéria hepática fetal. Este marcador pode ser aplicado na avaliação do grupo de risco intermediário após primeira do rastreio. O rastreio da trissomia 21 em dois estadios, orientado para o risco individual, é compatível com os princípios básicos da prática clínica em todos os campos da medicina(153).

**Quadro 16. Desempenho do rastreio considerando os parâmetros ecográficos adicionais**

Ultrasound marker	Ultrasound marker + maternal age		Combined screening + ultrasound marker	
	Detection rate (%)	False positive rate (%)	Detection rate (%)	False positive rate (%)
<b>Ductus venosus flow</b>	65-75	5-21	96	2.5
<b>Fetal heart rate</b>	-	-	90	3
<b>Frontomaxillary facial angle</b>	69	5	95	5
<b>Nasal bone</b>	59.8-73	0.5-2.6	91	2.5
			97	5
<b>Tricuspid regurgitation</b>	59.4	8.8	87	1
			96	2.6

(Adaptado de (153))

#### 2.4.5 Bioquímica sérica materna

As gravidezes com aneuploidias fetais estão associadas a concentrações alteradas no soro materno de vários produtos feto-placentários, incluindo a AFP, a  $\beta$ -hCG livre, a inibina A, o estriol não conjugado (uE3) e a PAPP-A(153).

No primeiro trimestre e nas gravidezes com trissomia 21, a concentração sérica materna de  $\beta$ -hCG livre é duas vezes mais elevada e a da PAPP-A é reduzida para metade, quando em comparação com as gravidezes euploides(153). Em gestações euploides, o valor médio ajustado para ambos  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A é 1,0 MoM, enquanto que na trissomia 21 a MoM média para a  $\beta$ -hCG livre é de 2,0 e a MoM média para a PAPP-A é de 0,5 (ver Quadro 17.) e a diferença, para a  $\beta$ -hCG livre, entre gravidezes euploides e trissómicas aumenta com o tempo de gestação. No primeiro trimestre, a amplitude da diferença é, no entanto, mais pequena do que para a PAPP-A. Para este último, consegue-se um melhor desempenho às 9-10 semanas de gestação do que às 13 semanas, porque a diferença entre gravidezes euploides e trissómicas é maior no primeiro período. Nas trissomias 18 e 13, as concentrações séricas de  $\beta$ -hCG livre e de PAPP-A estão diminuídas (Tul et al., 1999; Spencer et al., 2000a). No caso de anomalias dos cromossomas sexuais, a  $\beta$ -hCG livre pode estar normal e a PAPP-A é baixa(179)(ver Quadro 17.).

**Quadro 17. Variação das MoM's dos parâmetros bioquímicos, nas diferentes aneuploidias.**

	Normal	Trissomia 21	Trissomia 18	Trissomia 13	46,XO	46,XXY
<b>β-hCG livre (MoM's)</b>	1,0	2,0 (↑)	0,2 (↓)	0,5 (↓)	1,1 (≈)	1,07 (≈)
<b>PAPP-A (MoM's)</b>	1,0	0,5 (↓)	0,2 (↓)	0,3 (↓)	0,49 (↓)	0,88 (≈)

(Adaptado de (146, 153))

#### 2.4.5.1 Proteína-A plasmática associada à gravidez (PAPP-A)

A proteína-A plasmática associada à gravidez (PAPP-A) é uma proteína encontrada na circulação das mulheres grávidas e que foi originalmente isolada por Gall Halbert (1972), como uma das quatro proteínas de origem placentária associadas à gravidez: PAPP-A, B, C e D. Duas eram já conhecidas proteínas placentárias (o lactogénio placentário (PAPP-D) e o PAPP-C) e as outras duas, PAPP-A e PAPP-B, foram descobertas *de novo* (180).

A PAPP-A é uma glicoproteína de peso molecular 750.000 KD e com uma mobilidade electroforética  $\alpha_2$ , tal como Bischof a descreveu em 1979. À época foi consensual o aumento da concentração com a idade gestacional e o seu desaparecimento algumas semanas depois do parto. Em 1979 e durante vários anos, PAPP-A não foi detectada no soro de homens ou mulheres não-grávidas. Pensava-se que era apenas produzida na placenta e secretada para a corrente sanguínea materna, pois tinha sido detectada no sincitiotrofoblasto, por imunofluorescência, em 1976 por Lin e Halbert, local de onde poderia ser extraída. Durante 25 anos seguintes, o conhecimento sobre a biologia da PAPP-A e sua função biológica permaneceu evasivo. Mais recentemente, a PAPP-A foi considerada membro fundador de uma subfamília de metaloproteinases, chamada pappalinas (181,182). A PAPP-A existe sob duas formas principais: na gravidez a circula como duas moléculas de PAPP-A covalentemente ligadas a duas moléculas de proMPB (proteína básica principal dos eosinófilos). Este complexo heterotetramérico de 2:2 é proteoliticamente inativo. Pelo contrário, a PAPP-A secretada por células de cultura e a PAPP-A produzida por células vasculares *in vivo*, é um dímero proteoliticamente ativo, não ligado covalentemente ao proMBP (182).

Contrariamente ao que se pensava desde 1979, a síntese da PAPP-A, em indivíduos não-grávidos, tem sido relatada em vários tecidos, como por exemplo, nos osteoblastos, nas células de músculo liso vascular, no corpo lúteo, nas trompas de Falópio, no endométrio, na próstata, no testículo, no rim, no cólon, no fígado, no pâncreas, no miocárdio, no baço, na medula óssea,

nos tumores trofoblásticos e no carcinoma de mama(181,182). O achado de que o mRNA da PAPP-A é sintetizado em todos os tecidos examinados, tanto reprodutivos como não reprodutivos, é surpreendente, e indica que a PAPP-A tem outras funções para além das associadas à gravidez: claramente, PAPP-A já não deve ser considerada apenas uma “proteína associada à gravidez”. A abundância específica de PAPP-A e do mRNA do proMBP varia entre tecidos; a placenta de termo tem níveis mais elevados (cerca de 200 vezes mais elevados) do que todo o tecido não-placentário testado. Este achado confirma que o local principal para a síntese de PAPP-A e de proMBP durante a gravidez é a placenta, concretamente a superfície das vilosidades placentárias em contacto com o sangue materno(183). Nem a PAPP-A ou o proMBP são sintetizados em tecidos não placentares em quantidades comparáveis com as da placenta.

A demonstração em 1999, por Lawrence et al.(181), de que a PAPP-A cliva especificamente a proteína ligante do factor de crescimento tipo insulina (*insulin-like growth factor binding protein-IGFBP-4*), de um modo dependente da presença de IGF-I ou IGF-II (*Insulin Growth Factor I ou II*), e que é, por sua vez, um inibidor da acção da IGF, parece indicar que a PAPP-A tenha um papel no sistema IGF/IGFBP, como um regulador importante da biodisponibilidade local IGF. A maioria dos trabalhos publicados até agora têm-se concentrado na PAPP-A como uma metaloprotease da IGFBP-4, derivada do sincíotrofoblasto. A IGFBP-4 é uma proteína inibidora e que se liga, com alta afinidade, às IGFs, evitando desse modo a sua interacção com o receptor IGF-I, que medeia o crescimento celular. A PAPP-A cliva a IGFBP-4 no meio da proteína, reduzindo consideravelmente sua afinidade para com as IGFs, libertando-os, desse modo, para a ligação ao seu receptor. Uma importante característica da interacção da PAPP-A com IGFBP-4 é a dependência da IGF(181). A PAPP-A surge como tendo um papel determinante no crescimento e desenvolvimento feto-placentar, através de sua capacidade proteolítica da IGFBP(183).

**Funções clínicas da PAPP-A:** a partir de 1990, a PAPP-A passou a ser utilizada clinicamente como marcador no rastreio do síndrome de Down. Os níveis séricos de PAPP-A aumentam de modo constante, em cada semana gestacional, numa gravidez euploide(147). Numa gravidez afectada por trissomia 21 ou trissomia 18 a concentração sérica materna da PAPP-A, no primeiro trimestre, pode reduzir-se para metade. A expressão placentar do mRNA da PAPP-A não é muito diferente entre uma gravidez normal e uma gravidez com trissomia, sugerindo que a diminuição do soro materno da PAPP-A em gestações trisómicas se deve a eventos pós-translacionais alterados, como os mecanismos que afetam a secreção proteica ou o transporte através da placenta. A taxa de detecção da PAPP-A individualmente é de aproximadamente 52% para 5% de taxa de FP(184).

Níveis reduzidos de PAPP-A circulante durante o primeiro trimestre, na ausência de síndrome de Down, estão também associados ao desenvolvimento de complicações na gravidez e à ocorrência de resultados fetais adversos como a pré-eclâmpsia, parto prematuro, aborto, PIG, RCF e diabetes gestacional (ver 2.4.3.) (171,186,187,189)(165,182,183,185). Uma explicação plausível para a relação entre baixos níveis de PAPP-A no soro, má função placentária e potencial PIG, resulta das referidas propriedades proteolíticas da PAPP-A sobre a IGFBP-4 e do seu papel importante sobre o sistema IGF/IGFBP. Níveis reduzidos de PAPP-A teriam menos acção proteolítica sobre a IGFBP-4, libertando menos IGF I e II activas (ficando inactivas, porque ligadas à IGFBP-4), e o resultado seria alteração na invasão do trofoblasto e o reduzido crescimento fetal(186). Tendo em conta as importantes implicações clínicas entre valores séricos baixos de PAPP-A e resultados fetais adversos atribuíveis à insuficiência placentar, por um lado, e o seu uso crescente como parâmetro de rastreio do primeiro trimestre, salienta-se a importância do seu uso como proteína que confere risco de insuficiência placentar(183).

#### 2.4.5.2 Fracção livre da subunidade $\beta$ da hormona gonadotrófica coriónica humana livre ( $\beta$ -hCG livre)

A hormona gonadotrófica coriónica humana (hCG), descrita há mais de 80 anos(187,188), é uma glicoproteína heterodimérica constituída por uma subunidade alfa ( $\alpha$ ) idêntica à de outras hormonas glicoproteicas (eg, TSH, FSH,LH)(189,190), e uma subunidade beta ( $\beta$ ), exclusiva da hCG(191).

Além de hCG intacta, existem diversas variantes de hCG no soro, urina e noutros fluidos corporais, durante a gravidez e em situações patológicas(63,192,193). No primeiro trimestre da gravidez, a  $\beta$ -hCG livre, como marcador de rastreio aneuploidias, é mais discriminativa do que a hCG total<sup>12</sup>. Quando combinada com a idade materna, TN e PAPP-A, a  $\beta$ -hCG livre apresenta melhor taxa de detecção do que o hCG total (2-3%). Às 13 semanas, a hCG total apresenta melhor taxa de detecção do que a  $\beta$ -hCG livre (1 a 2%)(147).

A hCG é secretada pelas células trofoblásticas da placenta entre o 8º e o 10º dia depois da concepção, atingindo o seu pico na circulação materna entre a 8ª e a 10ª semana de gestação. Os níveis séricos mais elevados de hCG são observados no primeiro trimestre da gravidez, para de seguida declinar e estabilizar nos restantes segundo e terceiros trimestres (pela 20ª

---

12. Se se usar a hCG intacta em vez da  $\beta$ -hCG livre, as taxas de detecção da trissomia 21 reduzem-se em 5%.

semana), enquanto que a progesterona e estrogénio continuam a aumentar até o fim da gravidez. A hCG intacta torna-se detectável no soro materno ( $\geq 25$  UI/l) cerca de 8 a 10 dias após a concepção e a sua concentração aumenta até atingir o seu pico (150.000-250.000 UI/l) às 8-10 semanas após a data da última menstruação. Nesta altura, as concentrações de hCG individuais apresentam uma grande variação, com valores que podem variar entre 5.000 para 300.000 UI/l. A sua concentração, entre a 11<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup> semanas de gestação completas, diminui aproximadamente 20% a 40%(147), para um nível estável de aproximadamente 12.000 UI/l no restante segundo e terceiro trimestres de gravidez, embora, novamente, possam ser encontradas grandes variações individuais. Em gravidezes gemelares os níveis de hCG são 30 a 50% mais elevados.

O papel da hCG é suportado pela observação de que a administração de anti-soros anti-hCG leva à interrupção da gravidez, e que o risco de aborto espontâneo está directamente relacionado com baixas concentrações de hCG. Embora o papel fisiológico da hCG durante a gravidez humana não esteja totalmente esclarecido, não há dúvida de que o papel primário da hCG, no início da gravidez, é de prolongar a vida funcional do corpo lúteo e assim manter a gravidez.

Para além de sua função endócrina, tem sido sublinhada a influência da hCG no sistema imunológico (ver também 1.5.2).

**Funções clínicas da  $\beta$ -hCG:** Para além da sua utilização no diagnóstico laboratorial de gravidez, a  $\beta$ -hCG (total e livre) passou a ser utilizada no 2<sup>o</sup> trimestre, e mais tarde no 1<sup>o</sup> trimestre, como marcador do rastreio de aneuploidias. A concentração sérica materna da  $\beta$ -hCG livre, entre as 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas, está aumentada para o dobro no caso da trissomia 21, diminuída para um quarto no caso da trissomia 18, e diminuída para metade no caso da trissomia 13 (ver Quadro 17.).

#### 2.4.5.3 O factor de crescimento placentar (PIGF)

O factor de crescimento placentar (PIGF) é um membro da subfamília dos factores de crescimento endotelial vascular (VEGF). É expresso pelas células do trofoblasto, e tem funções vasculogénicas, estando implicado na angiogénese e invasão trofoblástica das artérias espirais maternas(194).

O PIGF foi isolado na placenta humana de termo em 1991, mas pode ser também detectado noutros tecidos como o coração, o pulmão, o músculo e tecido adiposo. Tal como referido, a PIGF é redundante no normal desenvolvimento vascular e respectiva manutenção, mas con-

tribui para a angiogénese na gravidez, reparação de cicatrizes, crescimento tumoral e condições isquémicas. O principal papel clínico atribuído ao PIGF é no despiste pré-eclâmpsia. Por seu turno, os resultados das taxas de detecção do rastreio combinado do primeiro trimestre para o despiste das aneuploidias e outras patologias da gravidez podem ser melhoradas pela inclusão do PIGF sérico(195). Os níveis séricos maternos de PIGF às 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas de gestação estão diminuídos nas gravidezes com defeitos de placentação, que resultam especificamente em pré-eclâmpsia e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG), assim como em gestações com fetos afectados por trissomia 21(194,195).

No período das 8 a 10 semanas de gestação, dois estudos recentes (Koster et al. e Cowans et al.) referem resultados contraditórios relativamente ao valor acrescentado da PIGF no despiste das trissomias. Num outro estudo, Pandya (84) refere que o valor da PIGF no soro materno, às 8-13 semanas, nas gravidezes afectadas, se encontra reduzido, constatando que a determinação do PIGF melhora o desempenho do rastreio combinado do 1º trimestre. Em ambas as circunstâncias, gravidezes euploides e gravidezes afectadas por trissomia 21, existe uma associação significativa entre os níveis séricos de PIGF e PAPP-A, que presumivelmente refletirá os papéis destes péptidos no desenvolvimento placentário e/ou a sua origem comum no trofoblasto. A associação da PIGF à  $\beta$ -hCG livre e ao PAPP-A melhora substancialmente o desempenho do rastreio bioquímico do primeiro trimestre da trissomia 21.

#### 2.4.6 O algoritmo para obtenção de risco

Como parte integrante da avaliação de risco pré-natal utiliza-se um complexo algoritmo computacional, que gera o grau risco individual para as trissomias 21, 18 e 13. O uso de aplicações de software especializadas é considerado necessário para o despiste do síndrome de Down devido à natureza complexa do cálculo e da interpretação dos resultados, à necessidade de relatórios específicos para cada gestação e ao elevado número de amostras que são processadas. Os software de cálculo do risco utilizam curvas de Gauss para as distribuições das TN e dos valores séricos normais e afectados para calcular os rácio de probabilidade (*likelihood ratio* (LR)). Estes LR são descritos pelas médias de logaritmo de base 10 (log10) das MoM's, desvios padrão e coeficientes de correlação entre os marcadores séricos. Aplicações de software com estas características podem ser obtidas comercialmente(147): o Astraia ou o ViewPoint PIA database são programas informáticos aprovados e certificados pela Fetal Medicine Foundation (algoritmo FMF UK).

No desenvolvimento de algoritmos de risco para o rastreio combinado, a estimativa precisa do risco específico da gravidez exige ajustes nas quantificações de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A (MoM's destes parâmetros), tendo em conta a idade gestacional, o peso materno, a etnia, o tabagismo e método de concepção(196), calculando o rácio de probabilidades, baseado na sobreposição das distribuições multivariadas das curvas Gaussianas definidas pelos parâmetros das populações afectadas e não afectadas. O risco individual específico de cada gestação é calculado multiplicando o risco basal (*à priori*), para o síndrome de Down, (geralmente baseado na idade materna(197) ou em antecedentes de aneuploidias(142)), pelo rácio de probabilidade obtidos para cada variável(137).

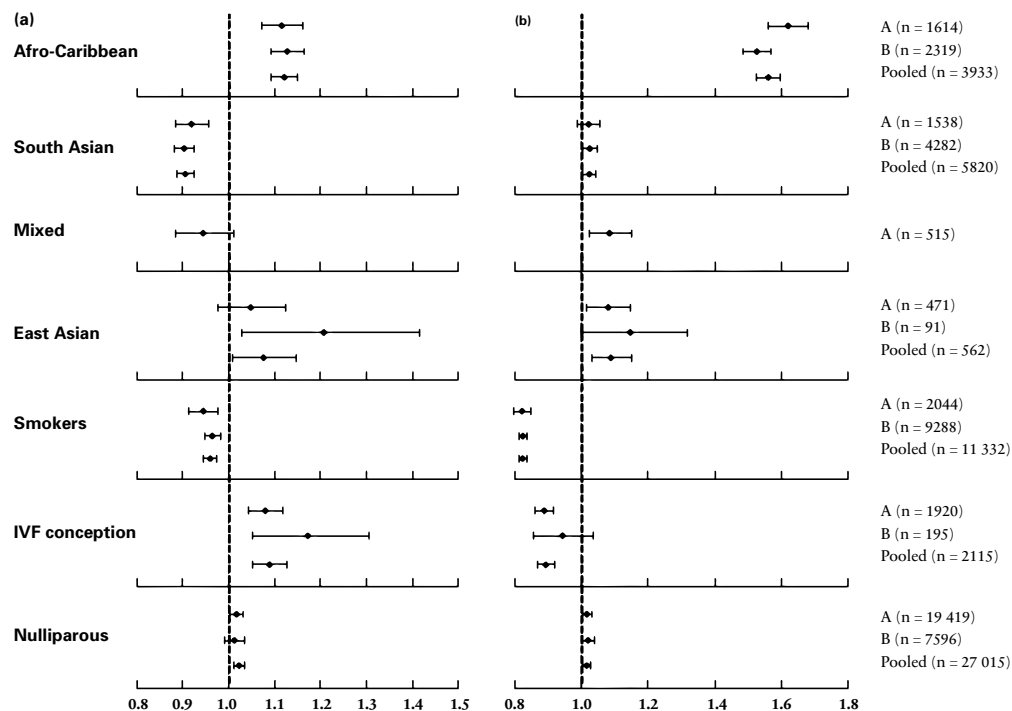
#### 2.4.6.1 Definição de risco individual

A decisão de cada casal, no que concerne ao desfecho da sua gestação, caso sejam confrontados com um risco acrescido, deve ser uma decisão baseada em informação adequada e o mais próxima do “estado da arte” possível. A obrigação do grupo de profissionais que se dedica ao diagnóstico pré-natal é o de fornecer um risco da gravidez estar afetada, usando o método mais exacto e permitindo aos pais decidirem a favor ou contra do teste invasivo(198). Deste modo é necessário caracterizar o risco de cada gestação, do modo mais individual possível, calculando-o a partir do risco *à priori* (como já referimos depende da idade materna e da idade gestacional - Quadro 11.) e multiplicando-o por uma série de factores, que dependem dos resultados dos achados ecográficos e dos testes bioquímicos maternos levados a cabo no 1º trimestre. De cada vez que um teste é executado, o risco anterior, que resultou da anterior multiplicação, é novamente multiplicado pelo factor do teste para calcular o novo risco, que se torna o risco de base a ser multiplicado pelo próximo teste. Em suma, o risco individual resulta da multiplicação do risco *à priori* pelo rácio de probabilidade de uma anomalia específica ou marcador(197,198). No acompanhamento de cada gravidez, o objectivo do rastreio é fornecer aos pais uma avaliação individualizada e exacta do risco de trissomia 21, na qual se possam sustentar para tomar a sua decisão sobre a realização posterior de um teste invasivo(199).

### 2.4.6.2 Os factores de correcção

No rastreio bioquímico do primeiro trimestre é recomendado que as MoM's dos valores medidos de  $\beta$ -hCG livre e de PAPP-A sejam ajustados para as características maternas e da gravidez, para que as mesmas não afectem de forma adversa a taxa de falsos positivos do teste de rastreio(200). As concentrações séricas dos referidos produtos placentários são afetadas por diferentes características maternas e relacionadas com a gravidez, incluindo a idade gestacional, peso materno, a etnia, o tabagismo, o método de concepção e a paridade, bem como o equipamento e reagentes utilizados para a análise. Consequentemente, no cálculo de risco para aneuploidias usando esses marcadores, é necessário ter em conta os efeitos dessas variáveis maternas nas MoM, antes de comparar gravidezes afectadas e não afectadas(196)(Figura 5.). Os factores de correcção são baseados nos dados demográficos das grávidas e outra informação relacionada com a gravidez que possa fazer melhorar o desempenho do rastreio, otimizando a interpretação.

**Figura 5.** Efeito estimado, sobre a (a) HCG e a (b) na PAPP-A, dos diferentes grupos étnicos, dos hábitos tabágicos, tipos de concepção e da paridade. O IC é de 95% .



(Adaptado de (196))

Data da colheita: a sensibilidade clínica e especificidade para o despiste do SD são mais elevadas às 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas de gestação. As medições de ambos os marcadores TN e PAPP-A têm melhor desempenho às 11 semanas completas (no caso da PAPP-A o melhor desempenho até ocorre às 9-10 semanas), enquanto que a  $\beta$ -hCG livre tem um desempenho que vai melhorando, desde as 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas completas.

**Idade gestacional:** O melhor desempenho do rastreio é obtido expressando a idade gestacional em semanas e dias ou semanas decimais (ex: 12 semanas, 5 dias são 12.7 semanas). Se o laboratório optar por reportar a idade gestacional como semanas completas, ela deve ser expressa em semanas (ex: 12 semanas, 5 dias são 12 semanas completas) em vez das semanas arredondadas (ex: 12 semanas, 5 dias são 13 semanas completas).

**Método de datação da idade gestacional:** No primeiro trimestre, o método mais comum para determinar a idade gestacional é a datação pela medição ecográfica do comprimento crânio-caudal (CCC). A medição do CCC das 11 às 13 semanas de gestação completas (ou antes) permite uma estimativa muito exacta da idade gestacional com uma variação de 3-4 dias.

**Peso materno:** para cada um dos analitos, as concentrações são em média mais elevadas em grávidas de menor peso e menores em mulheres de peso mais elevado, pelo efeito de diluição dos analitos. Todos os marcadores séricos do primeiro trimestre devem ser ajustados para o peso materno, no despiste das aneuploidias(201).

**Etnia materna:** os efeitos da pertença a determinados grupos étnicos estão bem definidos, com aumento nos níveis de PAPP-A de 25% (ou mais) em afro-americanos, e com alterações um pouco menores para a PAPP-A, a hCG e  $\beta$ -hCG livre nos grupos étnicos americanos-asiáticos e hispano-americanos. Tais mudanças devem ser contabilizadas nas interpretações de síndrome de Down(201,202), pois a não correcção para a etnia, no caso dos afro-americanos, pode condicionar uma aumento de falsos negativos por infra-estimação dos seus reais valores.

**Hábitos tabágicos maternos:** entre as fumantes, os níveis de ambos  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A são significativamente reduzidos para cerca de 15% a 20%, respectivamente, não sendo o efeito dependente do número de cigarros fumados(203,204). Se este facto não for levado em conta, poderá ocorrer uma sobre-estimação dos valores de PAPP-A, levando à ocorrência de um aumento de falsos positivos.

**Técnicas de reprodução medicamente assistida:** as concentrações dos marcadores do primeiro trimestre têm sido avaliadas em diferentes tipos de técnicas de reprodução assistida, principalmente na fertilização *in vitro*: face às variações do PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre encontradas

nestas circunstâncias, são necessários ajustes no algoritmo. Do mesmo modo que no tabagismo, as técnicas de reprodução medicamente assistida podem condicionar um acréscimo de falsos positivos, pela diminuição da PAPP-A.

**Gravidezes Gemelares:** No rastreio de gravidezes gemelares é necessário o ajuste das MoM's calculadas para se ter em conta a presença de dois fetos: de um modo geral, para a  $\beta$ -hCG livre, basta dividir a MoM observada e corrigida por 2.023. Os valores da PAPP-A, em gravidezes monocoriônicas, são mais baixos do que em gravidezes gemelares dicoriônicas pelo que são necessários dois factores, -2.192 em gravidezes dicoriônicas e 1.788 em gémeos monocoriônicos(205).

**Diabetes Mellitus insulino-dependente materna:** Nas gravidezes com diabetes mellitus insulino-dependente não são necessários ajustes nos marcadores TN fetal e  $\beta$ -hCG livre; no entanto, para o PAPP-A, ocorre uma redução de 15% em grávidas com DMID, pelo que é necessário adicionar um factor de correcção aquando do cálculo do risco de aneuploidias no primeiro trimestre(206).

Os factores de correcção decorrentes das variáveis maternas e aplicados sobre as concentrações séricas devem ser calculados utilizando técnicas de regressão apropriadas. Não é adequado incorporar esses factores numa única equação de regressão múltipla, pois nem todos as variáveis maternas estão disponíveis em cada gravidez. Cada factor de correcção deve ser aplicado separadamente, sendo a regressão primária a da obtenção da mediana do marcador sérico referido à idade gestacional, que determina os valores medianos normais. A regressão referida à idade gestacional não é afetada por outras variáveis, permitindo ao especialista em Medicina Fetal observar separadamente o efeito dos ajustes decorrentes da aplicação dos diferentes factores de correcção relacionados com as diferentes variáveis. A análise de regressão múltipla pode ser utilizada para definir a contribuição das variáveis maternas que influenciam a concentração  $\beta$ -hCG livre e a PAPP-A e a interação entre essas co-variáveis, no rastreio bioquímico do 1º trimestre. Em conclusão, para a utilização dos parâmetros bioquímicos ( $\beta$ -hCG livre e a PAPP-A) no rastreio da trissomia 21, é essencial que os valores medidos sejam ajustados para as características maternas e da gravidez(157)(ver figura 5.).

#### 2.4.6.3 Determinação dos valores medianos

A determinação das medianas dos marcadores séricos constitui o primeiro passo da estimativa de risco. Para a sua determinação deve ser utilizada uma amostra com idealmente um mínimo de 100 casos de cada semana gestacional completa, desde as 11<sup>+0</sup> às 13<sup>+6</sup> semanas.

Tratando-se de analitos estáveis, como é o caso da  $\beta$ -hCG livre e da PAPP-A, é possível a sua conservação a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$ , para ulterior utilização. Podem também ser utilizadas amostras consecutivas; embora no sentido estrito a determinação das medianas deva ser baseada em gravidezes não afectadas, dado que o SD é relativamente raro, os valores obtidos nessas gravidezes vão ter um efeito negligenciável na determinação da mediana, pelo que não é necessário que todas as amostras estejam documentadas quanto a corresponderem a gravidezes não afectadas(147), permitindo a obtenção de uma estimativa exacta das medianas obtidas dos valores de todas as grávidas rastreadas. A utilização da análises de regressão permite usar menos amostras para estabelecer medianas. A “suavização” dos valores medianos observados pela análise de regressão ponderada fornece medianas confiáveis e precisas. A utilização de valores da mediana que são específicos para cada dia da gestação melhora o desempenho do rastreio e o seu uso é incentivado.

Deste modo, para a conversão da concentração sérica de cada marcador bioquímico testado, num múltiplo da mediana (seu valor de MoM), recorre-se à divisão da concentração de cada um, determinado para cada grávida, pela mediana normal obtida em mulheres grávidas com a mesma idade gestacional(145). Essencialmente, cada concentração sérica determinada é primeiro convertida num valor múltiplo da mediana (MoM) específico para uma gravidez da mesma idade gestacional, peso materno, tabagismo, etnia e método de concepção, etc.. A distribuição das MoM's de cada metabolito, nas gravidezes não afectadas e nas com trissomia 21, é assumida como Gaussiana, especificada em termos de médias, desvios padrão e correlações. O modelo de regressão múltipla é usado para estimar os rácios de probabilidade (*likelihood ratios*-LR) para os marcadores bioquímicos que podem ser combinados com a idade materna, por forma a obter riscos específicos da grávida, em cada caso(196).

#### 2.4.6.4 Estimativa das taxas de detecção e de falsos positivos

As medidas de desempenho do teste de rastreio são a taxa de detecção (a proporção de gravidezes afectadas com resultados positivos), a taxa de falsos positivos (a proporção de gravidezes não afectadas com resultados positivos) e a probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR (*affected positive/unaffected positive*)). O quadro 18 resume as medidas de desempenho do rastreio combinado do 1º trimestre, em estudos publicados na literatura. As medidas de desempenho do teste variam com o ponto de corte utilizado, com a execução dos parâmetros ecográficos e bioquímicos, com os equipamentos utilizados, com o software e com os factores de correcção implicados na produção do risco individual(207).

**Quadro 18. Desempenho do Rastreo combinado do 1º trimestre nos diferentes estudos.**

Study	Gestation	Sample size	Trisomy 21 (N)	Incidence of trisomy 21	Median age	Women at age of ≥ 35 (%)	Cut-off level	DR %	FPR %
Bindra <i>et al.</i> 2002 [40]	11 – 14	15030	82	1:175	34.0	47.1	1:300	90.2	5.0
Crossley <i>et al.</i> 2002 [41]	10 – 14	17229	45	1:383	29.9	15.4	1:250	82	5
Wald <i>et al.</i> 2003 [16]	10 – 13	39983	85	1:470	-	-	1:310	83	5
Wapner <i>et al.</i> 2003 [42]	10 – 14	8514	61	1:135	34.5	50.0	1:270	85.2	9.4
Malone <i>et al.</i> 2005 [9]	11	38167	117	1:326	30.1	21.6	1:300	87	5.0
	12							85	
	13							82	
Rozenberg <i>et al.</i> 2006 [43]	11 – 13	14934	51	1:293	30.9	-	1:250	79.6	2.7
Kagan <i>et al.</i> 2008 [44]	11 – 13	56771	395	1:143	35.4	-	1:200	89	4.6
Okun <i>et al.</i> 2008 [45]	11 – 13	14487	62	1:234	34.0	-	1:200	83.9	4.0
	11	7250	66	1:110	32.0	-	1:250	86	4.9
Borrell <i>et al.</i> 2009 [46]	12							84	5.4
	13							83	6.1
	11-13	19736	122	1:162	34.5	-	1:150	91.0	3.1
Leung <i>et al.</i> 2009 [48]	11 – 13	10363	38	1:272	32.0	27.4	1:300	91.2	5.4
Schaelike <i>et al.</i> 2009 [49]	11-13	10668	59	1:181	-	31.0	1:300	88.1	4.9
Wortelboer <i>et al.</i> 2009 [50]	10 – 14	20293	87	1:233	34.3	">36 yr 38.7	1:250	75.9	3.3
	11-13	21492	80	1:269	30.7	-	1:250	80.0	8.8
Wright <i>et al.</i> 2010 [52]	7-14	223361	886	1:252	31.9	-	1:100	90.0	3.0
Engels <i>et al.</i> 2011 [16]	9-14	26274	121	1:217	34.1	≥36 yr	1:200	95.2 <36	6.6
		<36 17970	<36	<36		31.6		94.5	<36
		≥36	52	1:346				≥36	4.1
		8304	≥36	≥36				95.8	≥36
			69	1:120					13.0
Marttala <i>et al.</i> 2011 [53]	9 – 13	76949	188	1:409	29.3	19.3	1:250	81.9	4.3
Yeo <i>et al.</i> 2012 [54]	10-13	12585	31	1:406	-	-	1:300	87.1	5.1
	9-13	63945	<35	<35	<35	16.9	1:250	<35	<35
Peuhkurinen <i>et al.</i> 2012 [55]		<35	73	1:876	27.9			74.0	2.8
		50941	≥35	≥35	≥35			≥35	≥35
		≥35	115	1:113	37.8			87.0	11.9
		13004							

(Adaptado de (207))

### 2.4.7 Modelos de rastreio do primeiro trimestre

As actividades que conduzem ao rastreio das aneuploidias devem ser fornecidas como um serviço integrado. O programa de rastreio encerra muitos episódios separados que necessitam de ser coordenados e que incluem o ensaio dos parâmetros bioquímicos, a sua interpretação para obter uma estimativa do risco exacta, a ecografia usada para datar a gravidez e aferir os marcadores ecográficos, o aconselhamento e os procedimentos diagnósticos que se seguem, caso a grávida tenha sido considerada com risco acrescido. O rastreio não pode ser um conjunto de intervenções clínicas desgarradas, feitas de modo oportunístico, mas antes um processo bem organizado, de uma equipa especializada, que leve em linha de conta a disponibilidade de recursos(157).

O rastreio combinado do primeiro trimestre pode ser efectuado segundo diferentes modelos. Um exemplo é o conceito OSCAR(137) que implica a execução do exame ecográfico e sérico na mesma ocasião, bem como o posterior aconselhamento ao casal. Este modelo tornou-se viável com o aparecimento de equipamentos automatizados, precisos e reprodutíveis, que permitem a obtenção de resultados em de 30 min (de execução técnica). A idade gestacional ideal para a aplicação do conceito OSCAR é às 12 semanas, sendo a taxa de detecção da trissomia 21 de 90% e a taxa de falsos-positivos de 5%.

Uma outra abordagem possível é a execução da ecografia e da colheita de sangue em simultâneo, diferindo o processamento da amostra para o laboratório de referência, devidamente acompanhada do relatório da ecografia com a medida da TN e demais dados clínicos. É o laboratório de referência que elabora o relatório de risco combinado, posteriormente enviado para o obstetra num tempo útil de 24-48 horas, para atempado aconselhamento do casal.

O teste sequencial constitui uma alternativa às anteriores: a amostra de sangue é colhida poucos dias (9-10 semanas) antes do exame ecográfico (12 semanas), por forma que os resultados bioquímicos (PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre) possam estar disponíveis no momento da ecografia e o obstetra possa calcular o risco combinado individual e aconselhar o casal, na mesma visita. Este modelo permite aumentar a taxa de detecção de 90% para 93-94%, pois o parâmetro bioquímico PAPP-A, quando avaliado às 9-10 semanas, apresenta maior sensibilidade.

Uma quarta opção seria a de fazer a ecografia às 12 semanas e otimizar ao desempenho dos testes bioquímicos, medindo a PAPP-A às 9 semanas e a  $\beta$ -hCG livre na altura da ecografia (12 semanas) com um taxa de detecção estimada de 95%(153). Por último, a melhor estratégia de todas, que aumenta a taxa de detecção da trissomia 21, para um ponto de corte de 1 para 100,

para 95% (taxa de falsos positivos de 2,5%), é a que se consegue com a combinação de idade materna, parâmetros bioquímicos, múltiplos parâmetros ecográficos (CCC, TN, ON, DV, regurgitação da tricúspide)(208). Outras alternativas descrevem a possibilidade da execução dos exames bioquímicos séricos a todas as grávidas, seguido de TN fetal apenas nas grávidas com risco intermédio, decorrente da bioquímica. Os desempenhos obtidos não são superiores, obtendo-se taxas de detecção de 80 a 90% e taxas de falsos-positivos 4 a 6%.

Como resultado da aplicação dos modelos referidos acima, ocorreram várias mudanças nas últimas duas décadas: os testes de rastreio e de diagnóstico das aneuploidias passaram do segundo para o primeiro trimestre e a avaliação da gravidez às 11 semanas surge hoje em dia como essencial, não só no despiste das aneuploidias, mas também na antecipação de muitas patologias da gravidez, como sejam parto pré-termo, pré-eclâmpsia, nado-mortos, atraso de crescimento e macrossomia(209).

#### **2.4.8. Centro de referência e certificação FMF para o rastreio Pré-Natal**

A certificação FMF do laboratório garante a qualidade e fiabilidade dos resultados bioquímicos, como parte integrante do cálculo do risco combinado do 1º trimestre, assim como a certificação ecográfica, garantem a qualidade e experiência das medições utilizadas no cálculo do risco combinado 1º trimestre. As auditorias associadas à certificação permitem demonstrar e evidenciar a manutenção da qualidade e da reproductibilidade das medições efectuados pelos diferentes intervenientes certificados.

O processo para atribuição da certificação pela FMF para o diagnóstico pré-natal - rastreio combinado 1º trimestre, obedece à aceitação e ao cumprimento de um conjunto de critérios, de carácter obrigatório, tais como a obtenção de equipamentos específicos, altamente precisos e exactos, para a execução dos parâmetros bioquímicos (PAPP-A e  $\beta$ -HCG livre), utilizados no cálculo do risco combinado; a execução de três níveis de controlo mais do que uma vez por dia, por forma a garantir um coeficiente de variação inferior a 3%; a participação nos ensaios de avaliação externa de qualidade da “UK-NEQAS for Maternal Serum Screening in the First Trimester (Down’s)” (a continuidade da certificação pela FMF está condicionada à demonstração dos resultados obtidos na avaliação externa de qualidade referida). É também obrigatório a utilização de software apropriado e certificado, para a obtenção do risco individual, com algoritmo de cálculo aprovado pela FMF e passível de ser actualizado anualmente.

É mandatório o preenchimento de um formulário/inquérito, que acompanha todas as amostras colhidas, para fornecimento de informação pessoal e clínica necessária à identificação e correcta interpretação do teste: informação básica sócio-demográfica; idade gestacional e método pelo qual é determinada; peso materno; etnia materna; número de fetos; história familiar de síndrome de Down; presença ou não de diabetes insulino-dependente; método de concepção; tabagismo; medição em mm da TN; medição em mm do CCC; identificação do ecografista e respectivo centro; etc (ver anexo 1). As grávidas devem dar o seu consentimento informado.

## 2.5. DESENVOLVIMENTOS NO RASTREIO PRÉ-NATAL

Em 2005, D'Alton afirmava que da extração de material fetal na circulação materna poderia vir a surgir a metodologia, não-invasiva, para o diagnóstico pré-natal das aneuploidias. Apesar do cffDNA, originado das células trofoblásticas apoptóticas, ter sido detectado em circulação materna em 1997(210), estas tecnologias não estariam disponíveis num futuro imediato(156). Nos últimos 25 anos, a procura contínua de métodos não invasivos para o diagnóstico pré-natal (*non invasive prenatal diagnosis-NIPD*) permitiu a obtenção de resultados aproximados e actualmente já aplicáveis na prática clínica. A aplicação destes métodos passou pelo utilização das células fetais, pelo uso do RNA fetal livre circulante (cffRNA) e pela utilização do DNA fetal livre circulante (cffDNA).

As células fetais intactas circulantes podem ser encontradas na circulação materna, mas a sua quantidade absoluta é ínfima e tornam-se difíceis de detectar. Outra importante razão que limitou a sua utilização no potencial diagnóstico pré-natal não invasivo é o facto de persistirem em circulação materna muito tempo depois do parto, podendo até subsistir em gravidezes posteriores(140). O cffDNA pode ser detetado, com segurança, a partir da 9ª semana gestacional(211). A dificuldade em determinar um pequeno aumento de cffDNA do cromossoma 21 foi inicialmente superada pela sequenciação genómica maciça paralela (*massively parallel genomic sequencing-MPSS*), que emergiu como a tecnologia que permitiu a separação fiável entre o DNA livre circulante materno e o fetal(212). A sequenciação genómica maciça paralela (MPSS) é uma análise aleatória de milhões de fragmentos de cffDNA que sequencia fragmentos curtos de cffDNA da mãe e do feto e atribuindo-os aos cromossomas específicos: o número de contagens de cromossomas é comparado com um valor controle de outros cromossomas, e se houver um excesso de um cromossoma específico (ex. cr21), deverá ser colocada uma suspeita de trissomia. Esta técnica obriga à análise de um grande número de fragmentos de DNA por amostra – estima-se que sejam cerca de 25 milhões - podendo

apenas algumas amostras ser analisadas em cada série, o que limita a sua utilidade clínica e eleva os seus custos(212). Mais recentemente surgiu outra metodologia, a análise digital de regiões seleccionadas (DANSR), que permite a análise directa do DNA fetal metilado, pela sequenciação selectiva de cromossomas relevantes(213). Esta técnica é potencialmente mais eficiente do que o MPSS, porque usa menos fragmentos genéticos(140) e tem elevada sensibilidade e especificidade. Na prática clínica, é considerada como alternativa inclusivamente mais barata(214,215).

Nas gravidezes trissómicas, o número de moléculas derivadas de um cromossoma extra, considerado como proporção de todas as moléculas sequenciadas, é maior do que nas gravidezes euploides. Os estudos publicados(213,216,217) em amostras de gravidezes com risco elevado para trissomia 21, evidenciaram que esta tecnologia de análise do cfDNA no sangue materno permite detectar >99% dos casos afectados, para taxas de falsos positivos de <0,1%(216,218). A capacidade de detetar um pequeno aumento na quantidade de um dado cromossoma no sangue materno de uma gravidez com trissomia comparado com a gravidez dissómica, está directamente relacionada com a proporção relativa da origem fetal/materna do cfDNA no sangue materno(218,219). Nas gravidezes de fetos únicos com risco elevado de aneuploidias no rastreio do 1º trimestre, cerca de 10% de cfDNA no sangue materno é de origem fetal. A origem cfDNA fetal no plasma materno é, em grande parte, a placenta, pelo que existe uma relação directa entre o aumento do nível sérico de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A e a fracção fetal. A fracção de cfDNA fetal diminuiu directamente com peso materno (ex. 12% em 60Kg para 6% em 120 kg), associação inversa para a qual se pensa contribuir o efeito de diluição plasmática. Factores independentes como o tempo de armazenamento do plasma, a idade materna, a etnia, o tabagismo, a translucência da nuca, o comprimento crâneo-caudal, sexo ou cariótipo, não contribuem significativamente para a fracção fetal.

A obtenção de um resultado no teste pré-natal não-invasivo requer uma fracção mínima cfDNA fetal de 3-4%. Se a fracção for inferior, as pequenas diferenças na circulação cfDNA entre gravidezes trissómicas e dissómicas não são detectáveis. Uma fracção fetal muito baixa, com a consequente impossibilidade de obtenção de um resultado no teste pré-natal não-invasivo, pode ocorrer em mulheres muito obesas ou em gestações com uma placenta pequena, por idade gestacional ou uma combinação destes dois factores(209).

Com as actuais taxas de desempenho (TD>99%; TFP<0,1%), estes testes ainda só são adequados como testes de rastreio mas fazendo diminuir acentuadamente o número de gravidezes que desnecessariamente são propostas para testes invasivos. Este teste está validado quer como teste de rastreio, que pode ser oferecido a toda a população de grávidas, independente do risco basal, quer como teste a ser executado após um teste de rastreio convencional com risco acrescido e antes de um teste invasivo(220).

Recentemente foi demonstrado que a sequenciação de DNA no plasma materno pode também permitir a construção de um mapa genético e mutacional de todo o genoma fetal. Deste modo, a sequenciação do DNA terá um papel cada vez mais importante nos cuidados obstétricos futuros(219). O eventual papel dos testes de cffDNA no diagnóstico pré-natal será o(158) de um teste de rastreio primário (substituindo os testes de rastreio actualmente disponíveis para o rastreio das Trissomias 21, 18, 13) ou de um “teste de rastreio secundário”. Uma vez que não é um teste de diagnóstico, a confirmação de resultados positivos por um teste de diagnóstico será sempre necessária. No entanto, a vantagem potencial do uso de cffDNA como um teste de rastreio secundário será a de reduzir o número de procedimentos invasivos e a resultante perda de fetos normais, tendo sido estimado que 98% dos procedimentos invasivos podem ser evitados, tendo por base os testes de cffDNA(220).

Na actualidade, os testes não invasivos permitem fazer o despiste das aneuploidias dos cromossomas 21, 18 e 13 acrescido dos cromossomas sexuais, permitindo deste modo alargar o âmbito do rastreio com elevadas taxas de deteção e diminutos falsos positivos, também para o síndrome de Turner (46,XO), Klinefelter (47,XXY), Jacobs (47,XYY) e síndrome do triplo X (47XXX).



## CAPÍTULO 3

# Placentação

Uma placentação normal é decisiva para uma gravidez de sucesso, envolvendo um complexo e coordenado processo em que o trofoblasto estabelece um diálogo dinâmico com o endométrio, a partir do contacto do córion de um blastocisto saudável e da *decídua basalis* do útero materno(84). Uma vez formada a placenta, o sangue do feto e da mãe não se misturam diretamente, mas através de uma fina membrana, que vai permitir ao feto absorver os nutrientes e o oxigénio do sangue materno e eliminar o dióxido de carbono e os produtos nitrogenados para a circulação materna.

## 3.1 DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DA PLACENTA

A diferenciação da trofoectoderme em trofoblasto sincicial invasivo é iniciado depois da adesão do blastocisto ao epitélio do endométrio, e este trofoblasto forma uma camada protectora em redor do blastocisto. Nas primeiras semanas de gravidez a estrutura das vilosidades da placenta, desenvolve-se, as projecções das vilosidades são revestidas por sinciciotrofoblasto resultante da fusão das células das vilosidades do citotrofoblasto, capilares fetais e, a partir do 2º trimestre de gravidez, transforma-se na maior rota de trocas de gases e nutrientes entre o feto e a mãe (Hamilton & Boyd 1960). O sinciciotrofoblasto é também local de síntese de hormonas críticas para a manutenção da gravidez. A máxima invasão da decídua pelas células do trofoblasto ocorre entre 5 e 12 semanas de gravidez(188).

Para o crescimento do feto humano são essenciais numerosos factores, entre os quais o crescimento do útero e o adequado crescimento placentar(221). Este último, por sua vez, está dependente da adequada invasão do trofoblasto, do aumento do fluxo sanguíneo uteroplacentário, do transporte de nutrientes e da produção e transferência de hormonas reguladoras do crescimento(187,192,222). Para uma eficiente placentação, o reconhecimento do trofoblasto pelo sistema imune materno é também crucial: se esse reconhecimento for deficiente, a placentação pode ser igualmente deficiente(223).

### 3.2 A INVASÃO DO TROFOBLASTO E O FLUXO SANGUÍNEO UTEROPLACENTAR

O blastocisto contém uma massa celular interna, a partir da qual se desenvolve o feto, e uma camada de células externa de trofoblasto, que se transformará em placenta. O trofoblasto fetal diferencia-se em células vilosas ou extra-vilosas e este último migra e invade o epitélio uterino materno, de modo a que o fluxo sanguíneo uteroplacentar possa aumentar à medida que a gravidez progride(189). Neste processo, as artérias uterinas espirais transformam-se em vasos maiores, de largo débito e baixa resistência, capazes de assegurar um elevado volume de sangue para placenta(192). Durante a remodelação das artérias espirais, dá-se a substituição das paredes musculares e elásticas das artérias, por camadas fibrinóides, envolvidas por células trofoblásticas, permitindo o fluxo sanguíneo intervilo de baixa pressão(192,224). A não ocorrência destas modificações nos segmentos das artérias espirais está associada à gravidez complicada por restrições de crescimento fetal. A combinação do desenvolvimento precoce de patologia no leito placentário e nas vilosidades com posterior patologia vascular isquémica/trombótica, resulta na chamada insuficiência placentária, que se apresenta clinicamente como crescimento fetal prejudicado, descolamento placentário, pré-eclâmpsia ou morte fetal(183).

### 3.3 PRODUÇÃO PLACENTAR DE FACTORES DE CRESCIMENTO E DE HORMONAS DE REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO

#### **3.3.1 Factores de crescimento Insulina-like (IGFs)**

As IGF-I e IGF-II são produzidos pela placenta (o mRNA do IGF-II predomina, relativamente à IGF-I, em todas as idades gestacionais) e actuam como reguladores locais de crescimento fetal(225). O eixo IGF tem um papel crucial no crescimento fetal (IGF-I e a IGFBP-1) e placentar (IGF-II)(193). Os factores de crescimento insulina-like I e II (IGF-I e IGF-II) são polipéptidos com propriedades mitogénicas que induzem a proliferação celular. As suas acções são reguladas pelas proteínas de transporte da classe IGFBP. Durante a gravidez, s IGFBP 2, 4, 5 e 6 estão presentes em baixas concentrações no plasma, enquanto que a IGFBP-1, regulada pela insulina, é a principal IGFBP no líquido amniótico e a principal proteína ligante de IGF's no plasma fetal. A IGFBP-1 liga-se à IGF-I e II com maior afinidade do que a qualquer outro receptor de IGF impedindo que as IGF's exerçam as suas acções mitogénicas(226). As concentrações de IGFBP-1 no soro materno aumentam no primeiro trimestre, têm um pico no meio da gravidez e mantêm-se constantes até ao parto(227).

### **3.3.2 O papel do PAPP-A na regulação do crescimento fetal e placentar**

A PAPP-A é uma protease da IGFBP 4 e 5. Os níveis reduzidos de PAPP-A teriam como consequência uma menor acção proteolítica sobre as IGFBP's, conduzindo a níveis mais elevados de IGF-I e II ligados à molécula transportadora e por consequência, biologicamente inactivos, reduzindo o crescimento fetal(167).

### **3.3.3 O papel da hormonas na regulação do crescimento fetal e placentar**

Tal como seria de esperar, a hormona hCG está envolvida em todos os processos promotores da gravidez e como tal, directa ou indirectamente envolvida no crescimento placentar e sobrevivência fetal: desde o reconhecimento da gravidez, na manutenção do corpo lúteo, na produção de progesterona, na melhoria da implantação embrionária e tolerância para com o embrião, na diferenciação do trofoblasto, na estimulação da vasculogénese e finalmente na regulação da relação imune materno-fetal(84). Algumas destas funções exemplificam a íntima relação existente entre o sistema imune e o sistema endócrino.

## **3.4. INFLUÊNCIAS MATERNAS NO DESENVOLVIMENTO UTEROPLACENTAR E FETAL DURANTE A GRAVIDEZ**

Muitas são as influências maternas com implicações no crescimento fetal através da função placentar, como é o caso da anemia, das infecções, do consumo de álcool e das gravidezes enxertadas em doenças inflamatórias maternas(228) tais como a artrite reumatóide, a doença inflamatória intestinal, o LES.

### **3.4.1. O papel do LES/Doenças autoimunes na regulação do desenvolvimento e crescimento fetal**

Os efeitos perinatais adversos mais comuns nas grávidas com LES e ou LES e SAF são o aborto, a restrição de crescimento intrauterino, a prematuridade, a morbilidade e mortalidade perinatal(112), que se pensa poderem resultar de alterações imunológicas na placenta. O estudo histológico da placenta revela anomalias vasculares uteroplacentares, lesões essas semelhantes às encontradas na pré-eclâmpsia, hipertensão e diabetes mellitus(98). O LES pode causar vasculite placentar, levando a uma perfusão reduzida na circulação intervilositária e subsequente hipóxia local. Sabe-se que em situações de oxigenação placentar reduzida o aumento da produção de hCG, que está directamente relacionada com a migração trofoblástica, pode constituir um mecanismo compensador que visa a manutenção da gravidez e preservar o fornecimento de oxigénio ao feto(229).



PARTE II

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL



## CAPÍTULO I

## Fundamentação e objectivos do estudo

I.1 FUNDAMENTAÇÃO

Nos capítulos anteriores, referentes ao rastreio pré-natal, salientou-se que a avaliação combinada da translucência da nuca (TN) fetal e dos níveis séricos maternos de PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre é, actualmente, o método de rastreio de eleição para o despiste das principais aneuploidias, no primeiro trimestre da gravidez(230,231).

Do mesmo modo, ficou claro que a correcta avaliação do risco está criticamente dependente da fiabilidade da determinação dos parâmetros bioquímicos, uma vez que pequenas mudanças nos níveis séricos de PAPP-A ou de  $\beta$ -hCG livre (eventualmente decorrentes de patologias associadas) podem resultar em substancial sobre ou subestimação do risco do síndrome de Down, com consequências potencialmente graves.

No passado, alguns autores (Maymon *et al.*, 2000; Ferriman *et al.*, 2000; Maymon *et al.*, 2001), descreveram a presença de valores, tanto aumentados como diminuídos, de hCG e de inibina A, no 2º e 3º trimestre em grávidas com LES e com SAF. Aliás, já em 1995, tinha sido descrita a associação entre a presença de resultados falsos positivos obtidos no rastreio bioquímico do segundo trimestre para o despiste do síndrome de Down, e a presença do anticoagulante lúpico (LA)(232). A positividade sérica foi relacionada, principalmente, com valores desproporcionadamente elevados de hormona coriónica gonadotrófica total (hCG) sérica. Na pequena casuística tratada de apenas três casos, apenas um apresentava doença autoimune pré-existente. Desta associação, ficou a sugestão de que a ocorrência de valores elevados de hCG total, num rastreio pré-natal, deveria, em gestações ecográfica e citogeneticamente normais, desencadear a pesquisa do LA e que, para além disso, as grávidas com doença autoimune pré-existente deveriam ser informadas do aumento da probabilidade de um resultado falso-positivo(233). Heinig relatou pela primeira vez, em 2007, a possível interferência do LES materno nos marcadores usados no rastreio combinado do primeiro trimestre(234), tendo encontrado, numa casuística de 10 grávidas com LES pré-existente, rastreadas para trissomia 21 no primeiro trimestre, níveis séricos aumentados de  $\beta$ -hCG livre. No entanto, face ao limitado poder estatístico do estudo não foi possível detectar diferenças significativas nas taxas de falsos positivos, antes ou depois do rastreio combinado do primeiro trimestre para as trissomias. Deste modo, concluiu Heinig, a avaliação do risco pré-natal para a trissomia 21

no primeiro trimestre não seria afectada em grávidas com LES, pelo que o rastreio combinado do primeiro trimestre poderia continuar a ser utilizado nesta população sem problemas significativos(234).

Face ao limitado número de trabalhos publicados e à limitada casuística dos mesmos, não se encontra ainda correctamente avaliada a eventual influência do LES ou de outras patologias autoimunes nos níveis séricos de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A, no primeiro trimestre da gravidez.

## I.2 OBJECTIVOS GERAIS

Estabelecer valores normativos Portugueses e de distribuição para as MoM's dos parâmetros séricos do primeiro trimestre, por semana de gestação: PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre;

Avaliar a influência que as doenças autoimunes têm sobre as MoM's individuais dos parâmetros bioquímicos PAPP-A e/ou  $\beta$ -hCG livre, utilizados no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre;

Saber se as doenças autoimunes podem condicionar um aumento da taxa de resultados falsos positivos, com consequente aumento do número de amniocenteses.

## I.3 HIPÓTESE

Existe um impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre, condicionando uma taxa de falsos positivos aumentada, com potenciais consequências para a saúde fetal e materna.

## CAPÍTULO 2

# Metodologia

## 2.1 PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

### 2.1.1 Desenho do estudo

Estudo longitudinal prospectivo, consistindo num rastreio pré-natal combinado de 1º trimestre para pesquisa de aneuploidias.

### 2.1.2 População em estudo

De acordo com Altman (1991)(231), descrevem-se diferenciadamente população-alvo, população estatística e amostra final.

#### População-alvo

Mulheres grávidas sujeitas a uma avaliação pré-natal de rotina com vista ao despiste e obtenção do grau de risco para as principais aneuploidias, utilizando o modelo de rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre.

#### População Estatística

É constituída por dois componentes:

- i) População residente no Reino Unido: trata-se de uma recolha consecutiva de 48.303 grávidas seguidas no “Harris Birthright Research Centre of Fetal Medicine - King’s College Hospital (Londres, UK), efectuada sistematicamente entre 2006 e 2011. População residente em Portugal: recolha consecutiva de 3.173 grávidas portuguesas, com rastreio realizado em instituição nacional formalmente certificada pela Fetal Medicine Foundation (FMF) efectuada sistematicamente entre 2007 e 2012.

Critério de exclusão - ausência de informação sobre o desfecho da gravidez, por desconhecimento do resultado de cariótipo.

### 2.1.3 Variáveis em estudo

Variáveis sociodemográficas – identificação, morada, email, contacto, data da colheita.

Variáveis biofísicas - etnia, idade, altura, peso actual e antes de engravidar.

Variáveis clínicas - doenças actuais ou progressas, patologia autoimune, medicação, hábitos tabágicos.

Variáveis obstétricas - paridade, tipo de concepção, história da gravidez actual, data provável do parto, história de gravidezes anteriores (IMG, rastreios anteriores, filhos anteriores com aneuploidias ou defeitos do tubo neural).

Variáveis ecográficas - colheita e registo de informação resultante da ecografia de 1º trimestre (data ecografia, nº de fetos, comprimento crâneo-caudal (CCC), idade gestacional determinada por medição do comprimento crâneo-caudal fetal, medição da espessura da translucência da nuca (TN), ossos do nariz (ON), diâmetro biparietal (DB), frequência cardíaca (FC), outra qualquer malformação fetal major).

Variáveis bioquímicas - resultados da execução laboratorial dos testes bioquímicos séricos (PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre) em autoanalísadores específicos.

Variáveis de resultados - A informação sobre os defechos da gravidez foi recolhida junto do médico assistente ou das gestantes. Foi feito o registo do cariótipo do feto/nascituro e do seu peso à nascença, assim como dos dados referentes ao tipo de parto, idade gestacional ao nascimento e eventuais complicações que possam ter ocorrido durante gravidez e o parto.

## 2.1.4 Métodos de análise laboratorial

A determinação e quantificação dos parâmetros analíticos PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre é efectuada em soro<sup>13</sup>. Descrevem-se em seguida os procedimentos padronizados para a sua realização.

### 2.1.4.1 Colheita da amostra biológica

A amostra biológica é obtida através dos seguintes passos:

- colheita de sangue venoso periférico materno, utilizando uma agulha de *gauge* 21 acoplada a um sistema de vácuo da marca BD<sup>TM</sup>, para interior de tubo seco (sem anticoagulante);
- retracção do coágulo de fibrina durante pelo menos 30 minutos, fazendo repousar o tubo seco primário em suporte adequado, à temperatura ambiente;
- centrifugação da amostra a 3000 r.p.m. durante 10 min, à temperatura ambiente;
- colocação do tubo primário no autoanalisador, para determinação quantitativa dos parâmetros bioquímicos referidos;
- após processamento analítico, decantação de parte da amostra de soro para tubo de seroteca e armazenamento a -80°C;

A amostra deve ser conservada, no caso de ser processada até 24 horas, a uma temperatura entre +2 a +8°C. Caso seja necessário exceder aquele intervalo para processamento, procede-se à congelação a -20°C ou a -80°C, não se recomendando a repetição de congelamentos e descongelamentos.

São necessários 26  $\mu$ L de soro para a determinação da concentração da  $\beta$ HCG livre e 50  $\mu$ L para a quantificação da PAPP-A. O tempo de execução de ambos os ensaios é de cerca de 30 minutos.

### 2.1.4.2 Determinação dos parâmetros analíticos

A execução analítica dos testes bioquímicos séricos (PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre), em centros certificados, só é permitida recorrendo aos autoanalisadores certificados pela Fetal Medicine Foundation - autoanalisador Brahms Kryptor (Thermo Fisher Scientific) e autoanalisador 6000 Delfia Xpress system (PerkinElmer) – cujo funcionamento a seguir se descreve.

---

13. Equipamento Kryptor: -hCG livre só em soro; PAPP-A em soro ou plasma heparinizado (não se deve usar plasma citratado ou EDTA). Equipamento DELFIA Xpress: -hCG livre; PAPP-A só em soro (o plasma não está validado).

### Autoanalisador Kryptor

O autoanalisador Brahms Kryptor (Thermo Fisher Scientific) executa imunoensaios imunométricos através da tecnologia TRACE (Time-Resolved-Amplified-Cryptate-Emission). Esta tecnologia baseia-se na transferência de energia não radioactiva (sinal fluorescente de longa vida útil na gama dos milissegundos a 620nm) de uma molécula dadora (európio), para uma molécula aceitante (proteína algácea quimicamente modificada-XL665), que produz um sinal de vida curta útil na gama dos nanosegundos a 665 nm, e que ocorre quando amostra é estimulada por laser de nitrogénio a 337 nm. A proximidade da molécula dadora e da aceitante, enquanto parte integrante do imunocomplexo que se gera na amostra, e a sobreposição do espectro de absorção, intensificam e aumentam a vida útil do sinal fluorescente, permitindo a medição da fluorescência, temporariamente atrasada. Esta metodologia é muito fiável, com coeficientes de variação (CV) inferiores a 3-3,5% (ver 2.1.5 – Parte II ), estando livre de interferências e da medição de sinais não específicos (estes últimos são corrigidos pela relação calculada entre as intensidades e os c.d.o.).

A curva de calibração é composta por 6 pontos de diferentes concentrações de analito altamente purificado. Deve ser realizada em cada novo lote de reagente, sendo repetida com regularidade. Os calibradores não podem ficar à temperatura ambiente mais de 2 horas, só podendo ser utilizados um única vez.

Depois de cada calibração, devem ser utilizados controlos de qualidade internos para validação das curvas de calibração. Devem ser utilizados em simultâneo três níveis de soros controlos, simulando o estado patológico baixo, alto e o estado normal (estes níveis de controlos são executados pelo menos uma vez por dia). Depois de reconstituídas, as amostras de soros controlo são estáveis durante 8 horas a 18-25°C, ou 24 horas a 2-8°C, podendo ainda ser divididas em alíquotas para posterior congelamento a -20°C (estabilidade de 1 mês).

Depois de descongeladas, as amostras e soro controlo devem ser homogeneizadas por agitação suave e utilizados de imediato, sem atingirem a temperatura ambiente, não se devendo recongelar. O tubo com amostra de soro controlo deve ser processado como se de uma amostra se tratasse. As boas práticas laboratoriais obrigam a que os três níveis de amostras de controlo sejam medidas com regularidade (pelo menos uma vez por dia ou mais, dependendo do volume de amostras testados diariamente), para se garantir a qualidade e estabilidade da curva de calibração e dos resultados analíticos obtidos, dos pacientes. Os resultados quantitativos das amostras de soros controlos devem ser analisados utilizando métodos estatísticos adequados, com base em gráficos de Levey-Jennings.

Não é esperado que as amostras das grávidas ultrapassem o valor do calibrador com a concentração mais elevada, mas caso ocorra pode ser programada uma diluição, automática ou manualmente.

### Autoanalisador Delfia Xpress

O segundo autoanalisador certificado pela FMF é o 6000 Delfia Xpress system (PerkinElmer), uma plataforma de acesso aleatório, que executa imunoenaios directos fluoroimunométricos de resolução temporal. O ensaio é composto por dois tipos de anticorpos: os anticorpos policlonais (derivados de coelho) que constituem a fase sólida do imunoenasão, e os anticorpos monoclonais marcados com europium (derivados de murganho) dirigidos contra um epitopo específico do analito em questão (Figura 6.). O “inductor DELFIA” dissocia as ligações de europium dos anticorpos marcados e estes formam quelatos altamente fluorescentes. A fluorescência do europium, de cada amostra, é proporcional à concentração do analito na amostra. Este equipamento, tal como o anterior, garante resultados de elevada reprodutibilidade (ver 2.1.5 – Parte II))

**Fig 6.** Ensaio fluoroimunométrico tipo “sandwich”



Também no Delfia, a curva de calibração é composta por 6 pontos de diferentes concentrações de analito altamente purificado. São calibradores que não necessitam de reconstituição e foram calibrados usando o método de RP-HPLC. Os calibradores devem ser mantidos refrigerados, a +2-8°C até ao prazo de validade. Cada calibrador pode ser utilizado para 3 calibrações. A curva de calibração em triplicado deve ser realizada em cada novo lote de reagente, sendo ajustada mensalmente e em cada novo lote. Após cada calibração devem ser utilizados controlos de qualidade internos para validação das curvas de calibração, antes de ser iniciado um ensaio de amostras de pacientes. A utilização de soros controlos é obrigatória, por forma garantir a validade diária dos resultados. Para testar o comportamento da curva de calibração,

devem ser utilizados três níveis de soros controlos para valores séricos e que simulam o estado patológico alto, baixo e o estado normal. De acordo com as boas práticas laboratoriais, os três níveis de amostras de controlo devem ser mensuradas pelo menos uma vez por dia ou mais, dependendo do volume de amostras testados diariamente, para se garantir a qualidade e estabilidade da curva de calibração e dos resultados analíticos obtidos, ao longo do dia. Estas amostras devem ser processadas exactamente da mesma forma que as amostras dos doentes e os resultados quantitativos das amostras de soros controlos devem ser analisados utilizando métodos estatísticos adequados, com base em gráficos de Levey-Jennings.

Não é esperado que as amostras das grávidas ultrapassem o valor do calibrador de concentração mais elevada e as amostras das grávidas não podem ser diluídas.

### 2.1.4.3 Valores de referência em gestantes no 1º trimestre

#### β-HCG livre

Os valores de referência (em IU/L) para o 1º trimestre de gestação, validados pela empresa que comercializa os reagentes da Brahms Kryptor (Thermo-Fisher Scientific) em amostras provenientes da Fetal Medicine Foundation, são os seguintes (Quadro 19.):

**Quadro 19.**

Período de gestação (semanas completas)	Número de amostras (n)	Concentração de β-HCG livre (IU/L)		
		5º percentil (IU/L)	Média (IU/L)	95º percentil (IU/L)
11 <sup>+0</sup>	>5 000	16,68	44,83	120,47
12 <sup>+0</sup>	>5 000	14,63	39,33	105,69
13 <sup>+0</sup>	>5 000	11,28	30,32	81,49
14 <sup>+0</sup>	>5 000	8,29	22,29	59,89

Os valores de referência (em IU/L) para o 1º trimestre de gestação (Quadro 20.), validados pela casa comercial que comercializa os reagentes da 6000 Delfia Xpress system (PerkinElmer), tendo utilizado amostras de grávidas para validar os intervalos de referência:

Quadro 20.

Período de gestação (semanas completas)	Número de amostras (n)	Concentração de $\beta$ -HCG livre (IU/L)		
		5º percentil (IU/L)	Média (IU/L)	95º percentil (IU/L)
11 <sup>+0</sup>	107	15,3	45,2	117
12 <sup>+0</sup>	150	14,5	38,0	115
13 <sup>+0</sup>	103	13,2	33,4	92

## PAPP-A

Os valores de referência (em IU/L) para o 1º trimestre de gestação, validados pela empresa que comercializa os reagentes da Brahms Kryptor (Thermo-Fisher Scientific), tendo utilizado amostras provenientes da Fetal Medicine Foundation, são os seguintes (Quadro 21.):

Quadro 21.

Período de gestação (semanas completas)	Número de amostras (n)	Concentração de PAPP-A (IU/L)		
		5º percentil (IU/L)	Média (IU/L)	95º percentil (IU/L)
11 <sup>+0</sup>	>5 000	0,632	1,587	3,986
12 <sup>+0</sup>	>5 000	1,040	2,612	6,560
13 <sup>+0</sup>	>5 000	1,543	3,874	9,730
14 <sup>+0</sup>	>5 000	2,062	5,178	13,005

Os valores de referência (em IU/L) para o 1º trimestre de gestação, validados pela casa comercial que comercializa os reagentes da 6000 DELFIA Xpress system (PerkinElmer), tendo utilizado amostras de grávidas, são os seguintes (Quadro 22.):

**Quadro 22.**

Período de gestação (semanas completas)	Número de amostras (n)	Concentração de PAPP-A (mU/L)		
		5º percentil (mU/L)	Média (mU/L)	95º percentil (mU/L)
11 <sup>-0</sup>	60	368	1063	2859
12 <sup>-0</sup>	61	652	1840	4826
13 <sup>-0</sup>	74	866	2851	7499

Para a obtenção do cálculo do risco individual para as anomalias cromossômicas (T21, T18, T13) é utilizado o software Viewpoint PIA DataBase versão 5.6.10.502, com algoritmo de cálculo aprovado pela FMF-UK. Para a utilização do algoritmo de cálculo é necessária a inserção de um conjunto pré-determinado de variáveis biofísicas, clínicas, obstétricas, ecográficas e bioquímicas. As variáveis bioquímicas são aferidas de acordo com as restantes variáveis, de modo a ser determinado um valor normalizado (MoM's), que irá ser utilizado na estimativa do risco individual, tal como referido no ponto 2.4.6 (Parte I).

### 2.1.5 Coeficientes de variação inter-ensaio

A avaliação dos coeficientes de variação inter-ensaio são parte integrante do processo de certificação de laboratório pela FMF. Esta especificação, definida pela Fetal Medicine Foundation, é um requisito de reproductibilidade/precisão dos equipamentos escolhidos por esta entidade, como únicos para a execução dos parâmetros analíticos em causa.

Desta forma, é esperado que os equipamentos evidenciem, na realização diária dos três níveis de controlo de qualidade interno, um coeficiente de variação inter-ensaio inferior a 3-3,5% (Quadro 23. e 24.). O centro laboratorial certificado participa também nos ensaios de avaliação externa de qualidade do UK-NEQAS for First Trimester Down's Syndrome Screening (ver anexos 3 e 4).

Quadro 23.

<b>B.R.A.H.M.S. KRYPTOR β-HCG livre</b>	<b>IU/L alvo</b>	<b>CV inter-ensaios</b>
CQ nível 1	≈85	≤3,0%
CQ nível 2	≈20	≤3,0%
CQ nível 3	≈8	≤3,5%
<b>B.R.A.H.M.S. KRYPTOR PAPP-A</b>	<b>IU/L alvo</b>	<b>CV inter-ensaios</b>
CQ nível 1	≈0,3	≤3,5%
CQ nível 2	≈1,5	≤3,5%
CQ nível 3	≈4,0	≤3,0%

Quadro 24.

<b>DELFIA Xpress β-HCG livre</b>	<b>ng/ml (IC)</b>	<b>CV inter-ensaios</b>
CQ nível 1	29-37	≤3,0%
CQ nível 2	48-60	≤3,0%
CQ nível 3	96-122	≤3,5%
<b>DELFIA Xpress PAPP-A</b>	<b>mU/L (IC)</b>	<b>CV inter-ensaios</b>
CQ nível 1	3507-4437	≤3,5%
CQ nível 2	1948-2464	≤3,5%
CQ nível 3	446-564	≤3,0%

## 2.2 CONDUÇÃO DO ESTUDO

Como foi feito até aqui, descrevem-se separadamente os procedimentos levados a cabo no Reino Unido e em Portugal, apesar das similitudes existentes entre ambos.

### **Amostra recolhida no Reino Unido**

A população estatística do Reino Unido (48,303 gravidezes únicas) resultou do programa de rastreio combinado do primeiro trimestre para o despiste das aneuploidias, a decorrer no Harris Birthright Research Center of Fetal Medicine - King's College Hospital (Londres), tendo sido sistematicamente recolhida entre Março de 2006 e Fevereiro de 2011. Deste número, foram excluídos 2,449 casos por ausência de informação sobre o desfecho da gravidez (inexistência de resultado de cariótipo), tendo-se chegado a uma amostra final de 45,854 casos.

Durante a avaliação individual, que decorreu entre a 11<sup>+0</sup> e a 13<sup>+6</sup> semanas de gestação, eram determinadas e registadas as características socio-demográficas da grávida (idade materna, grupo étnico, peso e altura materna, hábitos tabágicos), os antecedentes médicos (condições médicas pré ou co-existent) e a história obstétrica (método de concepção, paridade, etc). Toda a informação contida no questionário era revista pelo médico obstetra, em conjunto com a grávida.

Em seguida, era executada uma ecografia com três objectivos principais: determinação da idade gestacional (pela medição do comprimento crâneo-caudal fetal), medição da espessura da translucência da nuca e diagnóstico de anomalias morfológicas major.

Após colheita de sangue, as determinações séricas de PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre eram feitas num equipamento automatizado (Delfia Xpress system, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, USA), para obtenção de resultados reprodutíveis.

Após determinação algorítmica do risco individual para as trissomias 21, 18 e 13, nos casos de gravidezes consideradas como possuindo um risco acrescido (utilizando um ponto de corte de 1:100), era oferecido a possibilidade de execução de biópsia das vilosidades coriónicas ou de amniocentese, para obtenção de cariótipo fetal. Os resultados do cariótipo e os detalhes sobre os resultados da gravidez foram sendo adicionados à base de dados logo que disponíveis.

No quadro 25. pode encontrar-se uma súmula dos dados de caracterização mais significativos nesta amostra.

**Quadro 25. Caracterização da amostra de grávidas rastreadas no Reino Unido**  
(Amostra do RU)

<b>Variável</b>	<b>Amostra do RU</b>
<b>n</b>	<b>45.854</b>
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,04 (27,73-35,75)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	24,27 (21,94-27,77)
<b>Etnicidade (n (%))</b>	
Caucasiana	32374 (70,60)
Africana	9207 (20,08)
Asiática de Leste	1002 (2,19)
Asiática do Sul	1973 (4,30)
Mista	1298 (2,83)
Tabagismo na gravidez (n (%))	3629 (7,91)
<b>Concepção (n (%))</b>	
Espontânea	44241 (96,48)
Terapêutica Ovulatória	732 (1,60)
FIV	881 (1,92)
<b>Paridade (n (%))</b>	
Nulípara	22307 (48,65)
Multípara	23547 (51,35)
<b>História Médica (n (%))</b>	
Diabetes tipo 1	208 (0,45)
Diabetes tipo 2	139 (0,30)
Hipertensão Crónica	576 (1,26)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>	<b>40,05 ( 39,02 - 40,94)</b>
<b>Peso ao nascer (gr) mediana (IQR)</b>	<b>3400,0 (3078,0-3722,0)</b>

### **Amostra recolhida em Portugal**

A população estatística portuguesa (3.173 gravidezes únicas, rastreadas no primeiro trimestre de gravidez), foi sistematicamente recrutada entre 2007 e 2012 na Unidade Laboratorial de Diagnóstico Pré-Natal do Centro de Medicina Laboratorial Dr. Germano de Sousa, a qual se encontra certificada pela Fetal Medicine Foundation (FMF).

De uma total de 3.173 casos, foram excluídos 51 casos por ausência de informação sobre o desfecho da gravidez (ausência de resultados de cariótipos), pelo que a amostra final ficou constituída por 3,122 casos.

A todas as grávidas era solicitado, após assinatura do termo de consentimento informado (anexo 1), o preenchimento de um inquérito pré-natal, onde constavam os dados socio-demográficos e biofísicos individuais.

A informação clínica, história familiar e antecedentes obstétricos eram obtidas através do preenchimento de inquérito pré-natal pelo médico requisitante/assistente.

O relatório da ecografia, realizada no período entre as 11<sup>+0</sup> e as 13<sup>+6</sup> semanas de gestação, com o objectivo de determinar a idade gestacional, medir a espessura da translucência da nuca e identificar eventuais anomalias morfológicas major, era entregue no laboratório no acto da colheita. Após a colheita de amostra de soro, por venipunção periférica, eram executadas as determinações séricas de PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre, usando equipamento automatizado (Brahms Kryptor, Thermofisher) para obtenção de resultados reprodutíveis.

Os resultados das determinações, assim como a informação constante no inquérito, eram então introduzidos no software de cálculo do risco (ViewPoint 5.6.10.502), e os resultados do cálculo de risco individual para as trissomias 21, 18 e 13 (ponto de corte de 1:300) eram posteriormente enviados para a grávida e para o seu médico assistente. Os riscos individuais superiores ao ponto de corte são consideradas de “risco acrescido” para referidas aneuploidias; se por outro lado, o valor obtido no risco individual fosse inferior ao ponto de corte, as gravidezes são consideradas “sem risco acrescido”. A todas as grávidas da amostra portuguesa foi realizado um “inquérito de outcome” (anexo 2), por forma a conhecer o desfecho individual da gravidez e poder aferir os indicadores de desempenho do rastreio pré-natal. No quadro 26. pode encontrar-se. uma sùmula dos dados mais significativos referentes à amostra portuguesa.

**Quadro 26. Caracterização da amostra de grávidas rastreadas na população Portuguesa (Amostra PT)**

<b>Variável</b>	<b>Amostra do RU</b>
<b>n</b>	<b>3.122</b>
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,04 (29,53 - 34, 46)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	22,30 (20,50 - 24,60)
<b>Etnicidade (n (%))</b>	
Caucasiana	3058 (97,95)
Africana	39 (1,25)
Asiática de Leste	3 (0,10)
Asiática do Sul	15 (0,48)
Mista	7 (0,22)
Tabagismo na gravidez (n (%))	300 (9,61)
<b>Concepção (n (%))</b>	
Espontânea	3017 (96,64)
Terapêutica Ovulatória	17 (0,54)
FIV	88 (2,82)
<b>Paridade (n (%))</b>	
Nulípara	1064 (62,85)
Multípara	629 (37,15)
<b>História Médica (n (%))</b>	
Diabetes	3 (0,10)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>	<b>38,86 ( 38,00 - 39,71)</b>
<b>Peso ao nascer (gr,) mediana (IQR)</b>	<b>3150,0 (2860,0 - 3450,0)</b>

## 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi executada utilizando o Microsoft Excell 2007 e o Minitab 15 Statistical Software. Foi realizada uma análise estatística descritiva das diversas variáveis e características populacionais (médias, medianas e intervalos interquartis - IQR - frequências absolutas e relativas). A maioria dos resultados são apresentados como mediana (IQR).

Foram feitos cálculos das medidas de desempenho do algoritmo de rastreio pré-natal, como sejam a taxa de detecção, as taxas de falsos positivos e falsos negativos, os valores preditivo positivo e preditivo negativo, a sensibilidade e especificidade e o OAPR.

Foi pesquisada a normalidade dos dados da amostra e estudadas as transformações estatísticas das variáveis para população normal. Foi usado o Método de Anderson-Darling para testar a normalidade dos dados (distribuição Gaussiana).

A análise de médias e/ou medianas e análise de variância das variáveis foram estudadas nos grupos populacionais definidos.

Para a caracterização da população foi utilizada para cada variável contínua a mediana e o respectivo intervalo inter-quartil. O intervalo inter-quartil é uma medida de dispersão dos resultados obtidos na população e facilita a representação gráfica expondo os *outliers* da amostra, enquanto que o intervalo de confiança é uma medida de precisão da estimativa da mediana da amostra.

Foram realizados testes de hipóteses e intervalos de confiança para as variáveis em estudo: análise de variâncias (ANOVA) e o teste t-Student (test-t para amostras não emparelhadas) para comparar médias, em dois grupos com distribuição normal; o teste Mood's e o teste de Kruskal-Wallis para as medianas foram usados para comparação de amostras de dois grupos em que os dados não apresentavam distribuição normal.

Para a análise de proporções ou percentagens provenientes de diferentes amostras foi usado o teste binomial (*2 Proportion Test*). Este teste permite avaliar as diferenças entre duas proporções e calcular o intervalo de confiança associado. Como a amostra do Reino Unido é de grandes dimensões, e pretendemos avaliar taxas de ocorrência, o teste de Poisson pode ser também usado como uma alternativa para o teste binomial. Em determinados proporções foram realizados ambos os testes de hipóteses

Na apresentação dos resultados foi seguida a notação convencional:

- $p < 0,05$  – Teste significativo
- $p < 0,01$  – Teste muito significativo
- $p < 0,001$  – Teste altamente significativo

O software Minitab statistical release 15 (Minitab Inc, State College, PA, USA) foi usado para desenhar as “boxplots” dos dados que não apresentavam distribuição normal.

Para propósito da execução gráfica, os dados que apresentam distribuição normal (com ou sem variância idêntica) são apresentados como mediana (Inter Quartil Range (IQR)).

## **2.4 ASPECTOS ÉTICOS**

Os exames analíticos foram realizados num centro laboratorial certificado pela Fetal Medicine Foundation ([www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)), com a licença nº 7619, e seguem todos os requisitos éticos desta entidade.

Foi elaborado termo de consentimento informado a ser preenchido pelos participantes constituintes da amostra (ver anexo 1).

A utilização da base de dados do Harris Birthright Research Centre of Fetal Medicine, King’s College Hospital, London, UK, foi formalmente autorizada e enviada pelo seu Director, Professor Kypros Nicolaides (ver anexo 5).



## CAPÍTULO 3

# Resultados

Para efeitos de apresentação dos resultados, estes vão ser apresentados agrupados segundo as amostras a que pertencem (Reino Unido e Portuguesa).

### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO REINO UNIDO

De uma população estatística com um total de 48,303 casos, foram excluídos 2,449 casos por ausência de informação sobre o desfecho da gravidez (ausência de resultado de cariótipos). A amostra final estudada incluía um total de 45,854 gravidezes únicas, que fizeram o rastreio combinado do 1º trimestre. Esta amostra divide-se em dois grupos: o primeiro, constituído por 45,493 mulheres grávidas que não apresentavam patologias autoimunes anteriores à gravidez (grupo NAI), sendo o segundo formado pelas restantes 361 mulheres grávidas que, à data do rastreio combinado, eram portadoras de patologias autoimunes diagnosticadas (grupo AI). No quadro 27. podem observar-se as medianas populacionais para as variáveis maternas relevantes nos dois grupos.

**Quadro 27. Características das populações AI e NAI**

<b>Variável</b>	<b>Grupo NAI (n = 45493)</b>	<b>Grupo AI (n = 361)</b>
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,03 (27,71-35,74)	33,11 (29,73 – 36,54) **
IMC (kg/m2), mediana (IQR)	24,25 (21,94 – 27,77)	24,22 (21,78 – 27,88)
<b>Etnicidade (n (%))</b>		
Caucasiana	32077 (70,51)	297 (82,27)
Africana	9169 (20,15)	38 (10,53)
Asiática de Leste	1000 (2,20)	2 (0,55)
Asiática do Sul	1956 (4,30)	17 (4,71)
Mista	1291 (2,84)	7 (1,94)
<b>Tabagismo na gravidez (n (%))</b>		
	3595 (7,90)	34 (9,42)
<b>Concepção (n (%))</b>		
Espontânea	43903 (96,50)	338 (93,63)
Terapêutica Ovulação	722 (1,59)	10 (2,77)
FIV	868 (1,91)	13 (3,60)
<b>Paridade (n (%))</b>		
Nulípara	22140 (48,67)	177 (46,26)
Múltipara	23353 (51,33)	194 (53,74)
<b>História Médica (n (%))</b>		
Diabetes tipo 1	208 (0,46)	0 (0,00)
Diabetes tipo 2	136 (0,30)	3 (0,83)
Hipertensão Crónica	567 (1,25)	9 (2,49)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>	40,05 (39,02 – 40,95)	39,55 (38,43 – 40,60) **
<b>Peso ao nascer (gr), mediana (IQR)</b>	3400,0 (3080,0 – 3724,00)	3300,0 (2901,0 – 3655,0) **

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Na comparação das características populacionais entre os dois grupos encontraram-se diferenças estatisticamente muito significativas (t-Student e Teste de Mood para a Mediana) para as variáveis idade materna (AI- 33,11 anos, NAI – 32,03 anos,  $p<0,01$ ) e idade gestacional no parto (AI - 39,55 semanas, NAI - 40,05 semanas,  $p<0,01$ ). Quanto à única variável do recém-nascido que foi estudada (peso ao nascer), também se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AI (3300,0 gr) e o grupo NAI (3400,0 gr).

O grupo AI (n=361) é composta por 7 subgrupos (Quadro 28.) de diferentes patologias autoimunes, designadamente: **SAF** - síndrome anti-fosfolipídico; **DC** – Doença de Crohn's; **EM** – esclerose múltipla; **AR** – artrite reumatóide; **LES** – lúpus eritematoso disseminado; **CU** – colite ulcerosa; **Outros** – consiste num subgrupo de 31 grávidas com patologias autoimunes de menor incidência e que para a avaliação estatística são agrupados num único conjunto. Estão incluídas as seguintes patologias: espondilite anquilosante (n=8); síndrome Churg-Strauss (n=4); doença celíaca (n=5); síndrome Guillain-Barré (n=1); anemia hemolítica autoimune (n=3); psoríase (n=8); síndrome de Reiter (n=2).

**Quadro 28. Características do grupo NAI e de subgrupos do grupo AI**

Variável	Grupo NAI (n = 45493)	Grupo AI (n = 361)	
		SAF n=57	DC n=75
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,03 (27,71-35,74)	34,85 (29,79 – 37,76) **	33,50 (29,24 – 37,05) *
IMC (kg/m2), mediana (IQR)	24,25 (21,94 – 27,77)	25,78 (23,54 – 29,33)*	23,47 (20,99 – 26,70)
<b>Etnicidade (n (%))</b>			
Caucasiana	32077 (70,51)	44 (77,19)	67 (89,33)
Africana	9169 (20,15)	10 (17,54)	6 (8,00)
Asiática de Leste	1000 (2,20)	1000 (2,20)	0 (0,00)
Asiática do Sul	1956 (4,30)	1956 (4,30)	3 (5,26)
Mista	1291 (2,84)	1291 (2,84)	0 (0,00)
<b>Tabagismo na gravidez (n (%))</b>	3595 (7,90)	3595 (7,90)	1 (1,75)
<b>Concepção (n (%))</b>			
Espontânea	43903 (96,50)	53 (92,98)	70 (93,33)
Terapêutica Ovulação	722 (1,59)	0 (0,00)	2 (2,67)
FIV	868 (1,91)	4 (7,02)	3 (4,00)
<b>Paridade (n (%))</b>			
Nulípara	22140 (48,67)	23 (40,35)	36 (48,00)
Múltipara	23353 (51,33)	34 (59,65)	39 (52,00)
<b>História Médica (n (%))</b>			
Diabetes tipo 1	208 (0,46)	0 (0,00)	0 (0,00)
Diabetes tipo 2	136 (0,30)	3 (5,26)	0 (0,00)
Hipertensão Crônica	567 (1,25)	3 (5,26)	2 (2,67)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>	40,05 (39,02 – 40,95)	39,27 (38,26 – 40,67)	39,28 ** (38,40- 40,40)
<b>Peso ao nascer (gr), mediana (IQR)</b>	3400,0 (3080,0 – 3724,00)	3420,0 (3034,0 – 3680,0)	3152,0 * (2852,0 – 3670,5)

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

<b>Grupo AI (n = 361)</b>				
<b>EM n=47</b>	<b>AR n=50</b>	<b>LES n=47</b>	<b>CU n=54</b>	<b>Outro n=31</b>
32,48 (30,23 – 35,00)	34,07 (31,32 – 36,68) **	31,84 (28,22 – 35,00)	32,98 (29,03 – 35,97) *	32,07 (31,34 – 36,76) *
24,11 (21,40 – 28,85)	23,82 (21,86 – 27,28)	25,39 (21,71 – 30,26)	23,50 (21,18 – 28,25)	24,06 (21,26 – 27,06)
40 (85,11)	35 (70,00)	35 (74,47)	48 (88,89)	28 (90,32)
3 (6,38)	9 (18,00)	9 (19,15)	1 (1,85)	0 (0,00)
0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,13)	0 (0,00)
1 (1,33)	2 (4,26)	5 (10,00)	1 (2,13)	4 (7,41)
1 (1,33)	2 (4,26)	1 (2,00)	1 (2,13)	1 (1,85)
16 (21,33)	4 (8,51)	3 (6,00)	4 (8,51)	2 (3,70)
45 (95,74)	45 (90,00)	44 (93,62)	51 (94,44)	31 (100,00)
1 (2,13)	4 (8,00)	2 (4,26)	1 (1,85)	0 (0,00)
1 (2,13)	2 (4,00)	1 (2,13)	2 (3,70)	0 (0,00)
22 (46,81)	26 (52,00)	19 (40,43)	22 (40,74)	19 (61,29)
25 (53,19)	24 (48,00)	28 (59,57)	32 (59,26)	12 (38,71)
0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
0 (0,00)	1 (2,00)	2 (4,26)	1 (1,85)	0 (0,00)
39,96 (38,52 – 40,65)	39,80 ** (38,60 – 40,89)	38,98 (37,68 – 40,25)	39,47 (38,60 – 40,56)	39,77 * (38,76 – 40,60)
3456,0 (3095,0 – 3700,0)	3175,0 * (2859,0 – 3745,0)	3090,0* (2815,0 – 3568,5)	3325,0 (2876,0 – 3750,0)	3200,0 (2988,0 – 3537,5)

Da análise das características populacionais dos diferentes subgrupos de patologias AI (Quadro 28.), cada uma das patologias autoimunes apresentavam diferenças significativas ( $p < 0,05$  no caso de DC, CU e Outros) e muito significativas ( $p < 0,01$  no caso de SAF, AR) (t-Student Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) no respeitante à idade materna, exceptuando os subgrupo da EM ( $n=48$ , 32.4 anos) e do LES ( $n=51$ , 31.8 anos).

Relativamente à idade gestacional no parto, as diferenças encontradas no grupo AI são devido aos subgrupos DC (39.2 semanas), AR (39.8 semanas) e LES (38.9 semanas) (todos com  $p < 0,01$ ) e ainda no subgrupo Outros ( $p < 0,05$ ). No que respeita ao peso ao nascer, as diferenças estatisticamente significativas (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ) são também devido aos subgrupos DC, AR e LES (3090,0 gr), apresentando o LES mais uma vez a diferenciação maior.

### 3.1.1 Avaliação dos marcadores ecográficos e bioquímicos

Depois da caracterização da amostra, procedeu-se à avaliação dos marcadores ecográficos (CCC e TN) e bioquímicos ( $\beta$ -hCG livre e PAPP-A), usando a mesma metodologia que foi utilizada no ponto anterior (comparação inicial entre os grupos NAI e AI, seguida da comparação entre o grupo NAI com os subgrupos AI) (Quadro 29.).

**Quadro 29. Marcadores de 1º trimestre na grupo NAI e na grupo AI**

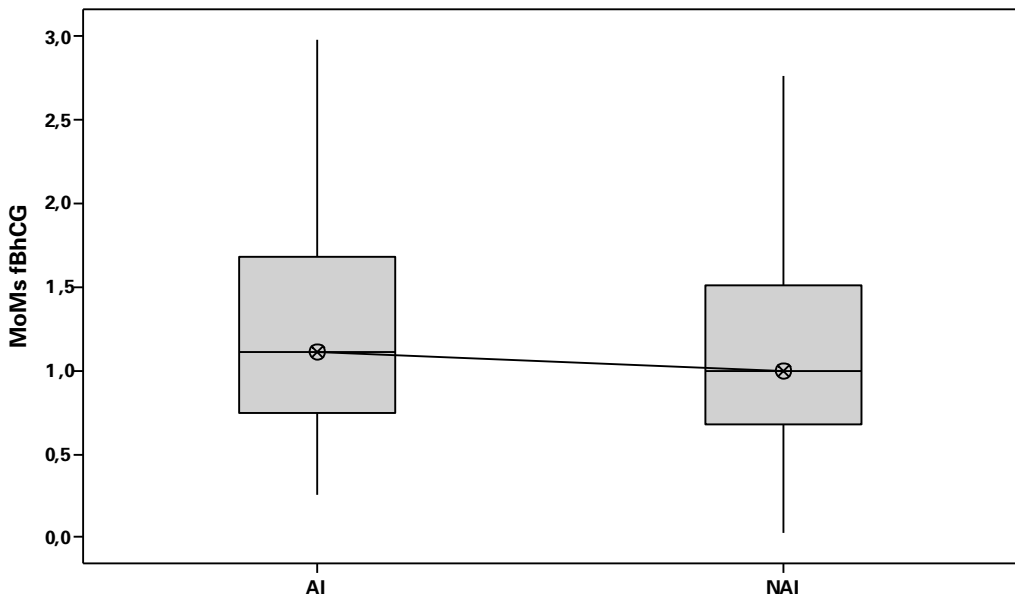
Variável	Grupo NAI (n = 45493)	Grupo AI (n = 361)
Idade Gestacional na altura do exame, semanas, mediana (IQR)	12,72 (12,36 – 13,12)	12,67 (12,34 – 13,01)*
<b>Marcadores Ecográficos</b>		
CCC, mm, mediana (IQR)	63,50 (58,60 – 69,00)	62,80 (58,40 – 67,45)*
TN, mm, median (IQR)	1,80 (1,60 – 2,10)	1,80 (1,50 – 2,10)
<b>Marcadores Bioquímicos</b>		
PAPP-A, U/L, mediana (IQR)	2,83 (1,79 – 4,42)	2,36 (1,58 – 3,72)*
PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	1,0025 (0,6858 – 1,4262)	0,9426 (0,6089 – 1,3576)
$\beta$ -hCG livre, U/L, mediana (IQR)	36,50 (24,30 – 56,20)	40,10 (27,35 – 61,90)*
$\beta$ -hCG livre, MoMs, mediana (IQR)	0,9944 (0,6761 – 1,5082)	1,1030 (0,7502 – 1,6640) **

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

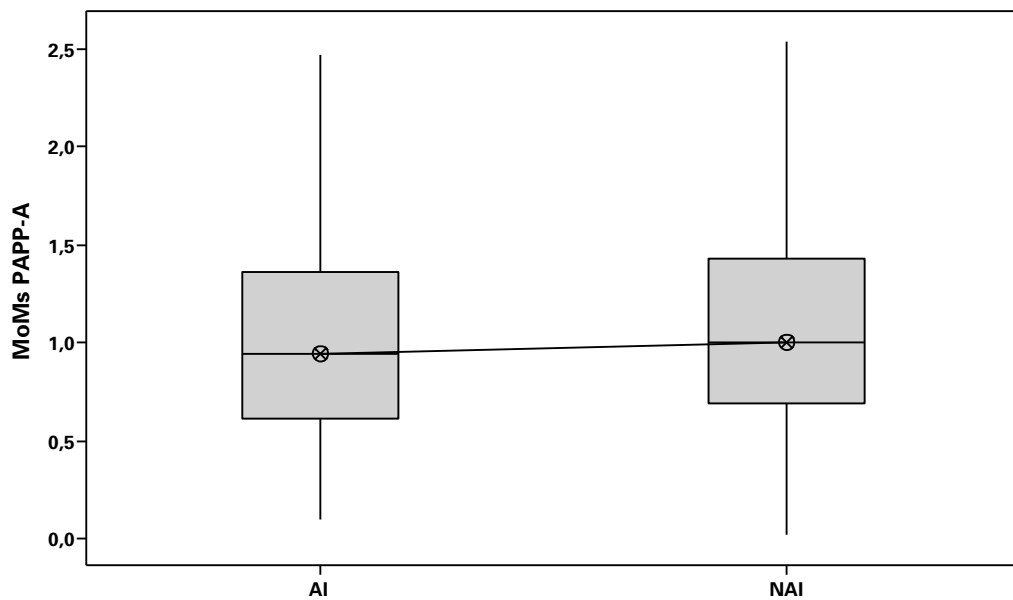
Comparando os resultados dos marcadores ecográficos entre os grupos NAI e AI, encontraram-se diferenças estatisticamente significativas (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ) na idade gestacional na altura do exame, consonantes com as diferenças encontradas no CCC, de onde derivam as respectivas idades gestacionais. O grupo NAI apresentava uma idade gestacional à data do exame de 12,72 semanas e um CCC de 63,50 mm, enquanto que o grupo AI apresentava valores de 12,67 semanas e 62,80 mm, respectivamente. Não foram encontradas diferenças no que respeita à medida da TN entre os dois grupos.

No que respeita aos marcadores bioquímicos, para o PAPP-A (em U/L) foram encontradas diferenças significativas (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ) entre NAI e AI, que deixaram de se observar quando os valores de PAPP-A foram convertidos em MoM's. Quanto à  $\beta$ -hCG livre, as diferenças encontradas entre os dois grupos foram estatisticamente significativas, tanto no que diz respeito à quantificação em U/L (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ), como quando foram convertidos os valores em MoM's (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,01$ ): observa-se um aumento significativo das MoM's de  $\beta$ -hCG livre no grupo AI (1.1030) versus o NAI (0.9944) (Quadro 29. e Figura 7.).

**Figura 7.** Boxplots das MoM's da  $\beta$ HCG livre entre a grupo AI e grupo NAI



**Figura 8.** Boxplot das MoM's da PAPP-A entre a grupo AI e grupo NAI



Nas duas boxplots expressas na figura 7. e 8. podem ser observadas as diferenças existentes entre a mediana da MoM da  $\beta$ -hCG livre no grupo AI, que é mais elevada do que em NAI. Do mesmo modo, pode observar-se a mediana do PAPP-A entre o grupo AI (mais baixa, mas sem ser estatisticamente significativo) e o grupo NAI.

No quadro 30. é possível observar as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) que se observaram no quadro 29., mas individualizadas pelos subgrupos de diferentes patologias autoimunes estudadas: as diferenças que ocorrem na quantificação do PAPP-A (U/L) devem-se à DC (2,56 U/L) (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ) e à miscelânea de doenças autoimunes com menor incidência (2,41 U/L) (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,01$ ), mas como já foi referido, não ocorrem na conversão para múltiplos da mediana. Na AR ocorre uma diferença estatisticamente significativa (t-Student e Teste de Mood para a Mediana,  $p < 0,05$ ) na MoM's da PAPP-A (0,8950).

**Quadro 30. Marcadores de 1<sup>o</sup> trimestre no grupo NAI e nos subgrupos do grupo AI**

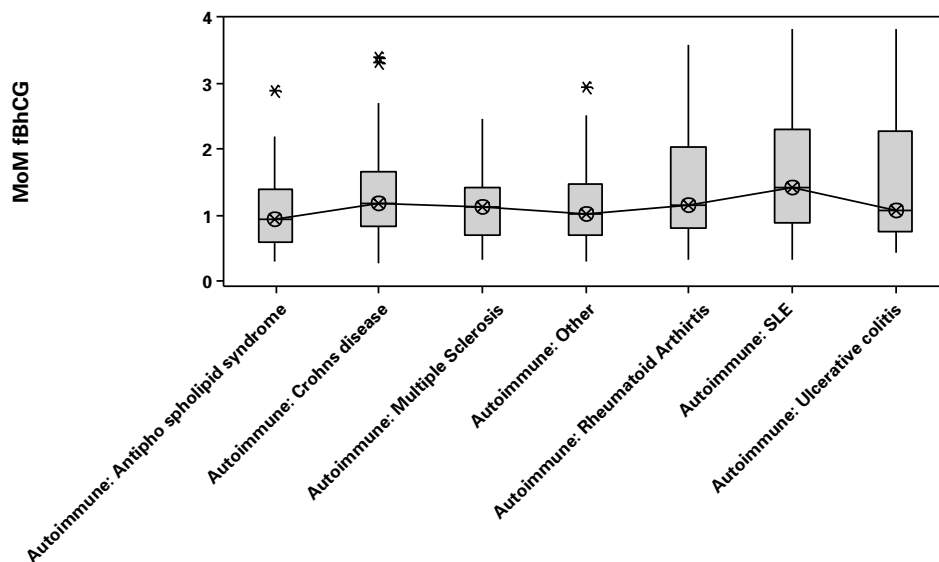
Variável	Grupo NAI (n = 45493)	Grupo AI (n = 361)						
		SAF n=57	DC N=75	EM n=47	AR n=50	LES n=47	CU n=54	Outro n=31
Idade Gestacional na altura do exame, semanas, mediana (IQR)	12,72 (12,36 – 13,12)	12,55 (12,27 – 13,01)	12,74 (12,46 – 13,11)	12,61 (12,33 – 13,05)	12,66 (12,34 – 12,99)	12,61 (12,40 – 13,06)	12,70 (12,34 – 12,90)	12,57 (12,26 – 12,83)
<b>Marcadores Ecográficos</b>								
CCC, mm, mediana (IQR)	63,50 (58,60 – 69,00)	61,20 (57,75 – 67,50)	63,70 (59,90 – 68,90)	62,00 (58,20 – 68,00)	62,70 (58,35 – 67,10)	61,90 (59,10 – 68,10)	63,10 (58,40 – 65,90)	61,40 (57,38 – 65,00)
TN, mm, median (IQR)	1,80 (1,60 – 2,10)	1,80 (1,50 – 2,05)	1,90 (1,60 – 2,10)	1,70 (1,50 – 2,10)	1,80 (1,60 – 2,10)	1,80 (1,50 – 2,00)	1,80 (1,50 – 2,20)	1,90 (1,70 – 2,10)
<b>Marcadores Bioquímicos</b>								
PAPP-A, U/L, mediana (IQR)	2,83 (1,79 – 4,42)	2,19 (1,55 – 3,78)	2,56 (1,74 – 3,65)*	2,20 (1,39 – 3,85)	2,25 (1,37 – 3,49)	2,14 (1,34 – 4,80)	2,78 (1,65 – 4,82)	2,41 (1,73 – 3,07)**
PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	1,0025 (0,6858 – 1,4262)	1,0191 (0,6233 – 1,4668)	0,9205 (0,6920 – 1,2234)	0,9835 (0,5651 – 1,2531)	0,8950 (0,4838 – 1,1958)*	0,9717 (0,5889 – 1,6383)	1,0419 (0,7075 – 1,5282)	0,8698 (0,7289 – 1,3070)
β-hCG livre, U/L, mediana (IQR)	36,50 (24,30 – 56,20)	31,20 (20,10 – 46,80)*	42,24 (30,60 – 60,60)	39,50 (27,40 – 53,70)	44,80 (28,88 – 81,50)*	51,10 (29,80 – 79,10)*	40,70 (26,30 – 66,00)	38,37 (28,50 – 59,30)
β-hCG livre, MoMs, mediana (IQR)	0,9944 (0,6761 – 1,5082)	0,9187 (0,5796 – 1,3907)**	1,1762 (0,8102 – 1,6555)	1,1129 (0,6676 – 1,3969)*	1,1303 (0,7993 – 2,0420)*	1,4020 (0,8715 – 2,2895)**	1,0239 (0,7278 – 2,2221)	0,9959 (0,6862 – 1,4663)

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ 

Sublinhe-se o aumento da MoM's da β-hCG livre, com um  $p < 0,05$ , nos subgrupos de doenças autoimunes (AI) estratificados, que ocorreram à custa do subgrupo da EM (1.11), do subgrupo da AR (1.13), mas sobretudo à custa do subgrupo do LES (1.40), com um  $p < 0,01$  neste último caso, estando estes subgrupos estatisticamente na mesma idade gestacional e com valores semelhantes de TN. No subgrupo de SAF encontrou-se uma diferença muito significativa ( $p < 0,01$ ), em que o valor da MoM's da β-hCG livre era mais baixo (0,9187) relativamente ao grupo NAI. (Quadro 30.)

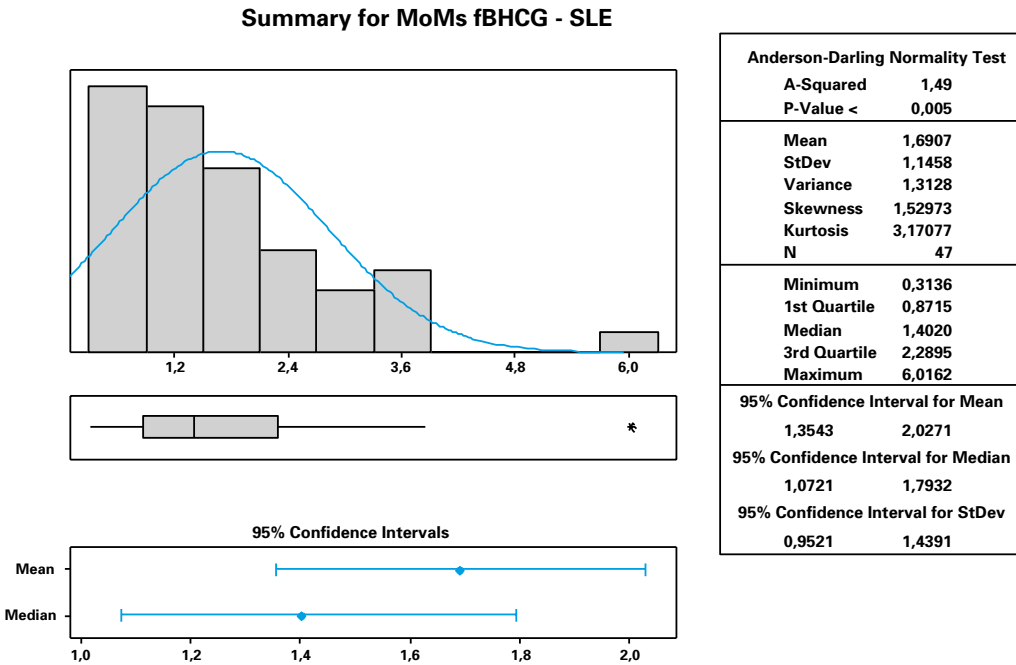
Na figura 9. estão evidenciadas as medianas das MoM's da  $\beta$ -hCG livre dos diferentes subgrupos de doenças autoimunes, destacando-se a do subgrupo LES.

**Figura 9.** Boxplots das MoM's da  $\beta$ HCG livre nos grupos de doença AI



No figura 10., relativamente ao subgrupo LES, estão expressos o estudo da normalidade e a caracterização das MoM's da  $\beta$ HCG livre, a sua média (1,6907 MoM), mediana (1,4020 MoM) e o intervalo inter-quartil (0,8715-2,2895).

**Figura 10.** Caracterização das MoM's da  $\beta$ -hCG livre do grupo LES



### 3.1.2 Avaliação dos indicadores de desempenho do rastreio pré-natal

Nos dois quadros seguintes, estão descritos os vários indicadores de desempenho do rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre da amostra, grupo NAI e grupo AI do Reino Unido: taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, taxa de verdadeiros positivos, taxa de verdadeiros negativos, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, sensibilidade ou taxa de detecção, especificidade e probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (*odds of being affected given a positive result – OAPR*), para o ponto de corte 1:300 (Quadro 31.) e ponto de corte de 1:100 (Quadro 32.).

**Quadro 31. Taxas de desempenho do rastreio pré-natal na amostra do Reino Unido**  
(amostra RU, grupo NAI e grupo AI) – Calculadas com base num ponto de corte de 1:300

Medidas de desempenho	Amostra RU	Grupo NAI	Grupo AI	p
Taxa de Falsos Positivos (TFP)	7,89%	7,85%	13,57%	0,002**
Taxa de Falsos Negativos (TFN)	0,12%	0,12%	0,28%	0,579
Taxa de Verdadeiros Positivos (TVP )***	0,67%	0,65%	2,77%	0,014*
Taxa de Verdadeiros Negativos (TVN)	91,31%	91,38%	83,38%	<0,001***
Valor Preditivo Positivo (VPP)	7,82%	7,68%	16,95%	0,059
Valor Preditivo Negativo (VPN)	99,86%	99,87%	99,67%	0,553
Taxa de Detecção (TD)****	84,34%	84,14%	90,91%	0,446
Especificidade	92,04%	92,09%	86,00%	0,001**
Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR)	1:12 [8,48%]	1:12 [8,32%]	1:5 [20,41%]	0,036*

*TFP - Taxa de Falsos positivos; TFN – Taxa de Falsos negativos; TVP – Taxa de Verdadeiros positivos; TVN - Taxa de Verdadeiros negativos; VPP – Valor Preditivo positivo; VPN –Valor Preditivo negativo; TD - Taxa de detecção; \*\*\* Incidência da Trissomia 21; \*\*\*\* Sensibilidade ; OAPR - Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (odds of being affected given a positive result).*

\* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

No quadro 31., as taxas de desempenho foram calculadas para um ponto de 1:300, e podemos observar que a taxa de detecção da amostra RU (n=45,854 casos) é de 84,34%, muito semelhante à do grupo NAI (84,14%). As especificidades da amostra RU e do grupo NAI são respectivamente de 92,04% e de 92,09%. Do mesmo modo, também se observam ordens de grandeza sobreponíveis nas taxa de falsos positivos na amostra RU (7,89%) e no grupo NAI (7,85%). A taxa de detecção do grupo AI (90,91%) não é significativamente diferente para com a do grupo NAI (84,14%).

A diminuição da especificidade para 86,00% (grupo AI) apresenta uma diferença muito significativa ( $p=0,001$ ) assim como o aumento da taxa de falsos positivos para 13,57% (grupo AI) ( $p=0,002$ ).

A diminuição da taxa de verdadeiros negativos para 83,38% (grupo AI) apresenta uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ) para com o grupo NAI.

O valor de OAPR é totalmente sobreponível entre a amostra do RU e o grupo NAI, observando-se no entanto que no grupo AI o OAPR passa de 1:12 (RU e NAI) para 1:5, diferença essa

que é significativa ( $p=0,036$ ), ou seja, em cada 5 grávidas com resultados de testes de rastreio positivo, 1 terá uma gravidez afectada para cada 4 que não a terão (dito de outro modo, em cada 5 exames invasivos, 1 corresponderá a uma gravidez afectada). Na amostra RU e no grupo NAI, em cada 12 grávidas com resultados de testes de rastreio positivo, 1 terá uma gravidez afectada para 11 que não a terão (isto é, em cada 12 exames invasivos, 1 corresponderá a uma gravidez afectada). Uma referência importante à taxa de verdadeiros positivos (TVP) no grupo AI que se encontrou ser de 2,77%. Esta taxa sugere que a prevalência das aneuploidias no grupo de doenças autoimunes (grupo AI) é mais elevada e a diferença é significativa (teste binomial,  $p=0,014$ ), quando comparada com a taxa encontrada na grupo NAI (0,65%), e mais elevada do que a taxa encontrada na amostra RU (0,67%).

### Quadro 32. Taxas de desempenho do rastreio pré-natal na população do Reino Unido

(Global, NAI e AI) – Calculados com base num ponto de corte de 1:100

Medidas de desempenho	Amostra RU	Grupo NAI	Grupo AI	p
Taxa de Falsos Positivos (TFP)	3,26%	3,23%	6,37 %	0,015*
Taxa de Falsos negativos (TFN)	0,18%	0,18%	0,28 %	0,721
Taxa de Verdadeiros Positivos (TVP)***	0,61%	0,60%	2,77 %	0,012*
Taxa de Verdadeiros Negativos (TVN)	95,95%	95,99%	90,58 %	<0,001***
Valor Preditivo Positivo (VPP)	15,89%	15,61%	30,30 %	0,068
Valor Preditivo Negativo (VPN)	99,81%	99,81%	99,70 %	0,695
Taxa de Detecção (TD)****	77,47%	77,05%	90,91 %	0,122
Especificidade	96,72%	96,74%	93,43 %	0,012*
Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR)	1:5 [18,89%]	1:5 [18,50%]	1:2,3 [43,48 %]	0,016*

TFP – Taxa de Falsos positivos; TFN – Taxa de Falsos negativos; TVP – Taxa de Verdadeiros positivos; TVN – Taxa de Verdadeiros negativos; VPP – Valor Preditivo positivo; VPN – Valor Preditivo negativo; TD – Taxa de detecção; \*\*\* Incidência da Trissomia 21; \*\*\*\* Sensibilidade; OAPR - Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (odds of being affected given a positive result).

\* $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$

No quadro 32., as taxas de desempenho foram calculadas para um ponto de 1:100, e podemos observar que a taxa de detecção na amostra RU (45.854 casos) é de 77,47%, muito semelhante à do grupo NAI (77,05%).

As especificidades na amostra RU e no grupo NAI são respectivamente de 96,72% e de 96,74%. Do mesmo modo, também se observam ordens de grandeza sobreponíveis na taxa de falsos positivos na amostra RU (3,26%) e no grupo NAI (3,23%).

A taxa de detecção do grupo AI (90,91%) não representa uma diferença significativa relativamente ao grupo NAI (77,05%). No entanto, a diminuição da especificidade para 93,43% (grupo AI) apresenta uma diferença significativa ( $p=0,012$ ) assim como o aumento da taxa de falsos positivos para 6,37% (grupo AI) ( $p=0,015$ ).

A diminuição da taxa de verdadeiros negativos para 90,58% (grupo AI), apresenta uma diferença altamente significativa relativamente ao grupo NAI (95,99%).

O valor de OAPR é totalmente sobreponível entre a amostra RU e o grupo NAI, observando-se no entanto uma diferença significativa ( $p=0,016$ ) no grupo AI, em que o OAPR passa de 1:5 (global e NAI) para 1:2,3: isto é, em cada 2,3 grávidas com resultados de testes de rastreio positivo, 1 terá uma gravidez afectada para cada 1,3 que não a terão (em cada 2,3 exames invasivos, 1 corresponderá a uma gravidez afectada). Já na amostra RU e grupo NAI, em cada 5 grávidas com resultados de testes de rastreio positivo, 1 terá uma gravidez afectada para cada 4 que não a terão (em cada 5 exames invasivos, 1 corresponderá a uma gravidez afectada).

Por último, a taxa de verdadeiros positivos no grupo AI (2,77%), sugere que a prevalência das aneuploidias no grupo AI é significativamente mais elevada ( $p=0,012$ ) que a do grupo NAI (0,60%) e da amostra RU (0,61%).

**Quadro 33. Proporção de grávidas com idade  $\geq$  35 anos (grupo de risco)**

Idade Materna	Amostra RU	Grupo NAI	Grupo AI	p
$\geq$ 35 Anos	13668/45854 [29,81%]	13539/45493 [29,76%]	129/361 [35,73%] *	0,018

\* $P<0,05$

No quadro 33. verifica-se que a proporção de mulheres com mais de 35 anos no grupo AI é de 35,73%, acima da proporção de mulheres com mais de 35 anos no grupo NAI, com uma diferença significativa de  $p=0,018$ .

No quadro 34. podemos verificar que os falsos positivos no grupo AI ( $n=49$ ; TFP= 13,57%) podem ser distribuídos em 4 grupos diferentes, consoante a TN e a positividade ou não dos resultados bioquímicos: i. no grupo de  $TN>3,5$  mm e bioquímica positiva, não foram

encontrados nenhuns resultados falsos positivos; ii. no grupo de  $TN > 3,5$  mm e bioquímica negativa, foram encontrados 3 resultados falsos positivos (0,83%), distribuídos no intervalo de ponto de corte 150-200 ( $n=2$ ) e 0-50 ( $n=1$ ); iii. no grupo de  $TN < 3,5$  mm e bioquímica positiva, foi encontrado o maior número de falsos positivos ( $n=41$ ; 11,36%), na sua maioria alocados ao intervalo de ponto de corte de 0-50 (4,16%); iv. no grupo de  $TN < 3,5$  e bioquímica negativa, foram encontrados apenas 1,38% ( $n=5$ ) falsos positivos.

**Quadro 34. Taxa de falsos positivos da população AI, distribuídos pelos escalões de TN e de pontos de corte** – Calculados para um ponto de corte de 1:300

<b>Falsos positivos da Grupo AI</b>	<b>n</b>	<b>TFP (%)</b>
Falsos positivos	49	13,57%
<b>TN <math>\geq</math> 3,5 mm e bioquímica positiva</b>	0	0,00%
<b>TN <math>\geq</math> 3,5 mm e bioquímica negativa</b>	3	0,83%
0-50	1	0,28%
50-100	0	0,00%
100-150	0	0,00%
150-200	2	0,55%
200-300	0	0,00%
<b>TN <math>&lt;</math> 3,5 mm e bioquímica positiva</b>	41	11,36%
0-50	15	4,16%
50-100	6	1,66%
100-150	7	1,94%
150-200	3	0,83%
200-300	10	2,77%
<b>TN <math>&lt;</math> 3,5 mm e bioquímica negativa</b>	5	1,38%
0-50	0	0,00%
50-100	1	0,28%
100-150	4	1,11%
150-200	0	0,00%
200-300	0	0,00%

O quadro 35. é uma tabela resumo das médias e medianas dos parâmetros bioquímicos, obtidos nos casos de resultados falsos positivos para aneuploidias, nos grupos NAI e AI. As medianas da  $\beta$ -hCG livre e do PAPP-A foram aferidas a partir dos casos pertencentes a estes grupos que apresentavam resultado de “risco acrescido” para T21, mas que se verificaram ser falsos positivos.

O aumento dos MoM’s da  $\beta$ -hCG livre nos casos dos falsos positivos com “risco acrescido”, em especial, sai reforçado da observação dos dados constantes da quadro 36., no estudo do *ratio* das MoM’s da  $\beta$ -hCG livre entre grupos AI e NAI, e em particular no subgrupo LES (*ratio* das medianas da MoM da  $\beta$ -hCG livre no subgrupo LES = 1,530).

**Quadro 35. Médias e medianas dos parâmetros bioquímicos, em casos de falsos positivos**

		Falsos positivos para Aneuploidias					
		Grupo NAI		Subgrupo SAF		Subgrupo LES	
		Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana
<b>Grupo NAI</b>	$\beta$ HCG livre (MoM’s)	2,117	1,745				
	PAPP-A (MoM’s)	0,710	0,598				
<b>Grupo AI</b>	$\beta$ HCG livre (MoM’s)	2,273	1,774	1,184	1,376	2,536	2,669
	PAPP-A(MoM’s)	0,718	0,593	0,950	0,609	0,618	0,426

**Quadro 36. Rácio Médias e Medianas de MoMs dos parâmetros bioquímicos [Ratio MoMs AI / MoMs NAI], em casos de falsos positivos**

		Falsos positivos para Aneuploidias					
		Grupo NAI		Subgrupo SAF		Subgrupo LES	
		Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana
Ratio MoMs AI / MoMs NAI	βHCG livre (MoM's)	1.074	1.017	0.559	0.788	1.198	1.530*
	PAPP-A(MoM's)	1.011	0.991	1.338	1.018	0.870	0.712

Por último, no quadro 37 é possível observar um resumo dos resultados das variáveis biofísicas, obstétricas, ecográficas, bioquímicas, assim como as proporções de rastreios com risco positivo basal, os rastreios com risco positivo combinados e a taxa de falsos positivos, apenas no subgrupo LES.

Da comparação entre a o grupo NAI e o subgrupo LES, podemos verificar não se encontraram diferenças significativas em nenhuma variável, sendo as populações muito semelhantes, tanto na idade materna, como no IMC, na idade gestacional na altura do exame, nas medidas ecográficas e na PAPP-A. Em todas estas características não foram encontradas diferenças significativas, excepto nas MoM's da β-hCG livre, como já foi referida antes: grupo LES-1,4020 e NAI-0,9944 ( $p=0,009$ ).

A proporção de mulheres com risco basal, baseado na idade materna, foi de 19,15% no subgrupo LES e 23,06% no grupo NAI, sem diferenças significativas. A proporção de grávidas do subgrupo LES e do grupo NAI com resultado de risco acrescido no rastreio combinado foi de 19,5% (este valor coincidentemente idêntico foi validado por diversas ocasiões - com o acréscimo das variáveis bioquímicas, algumas grávidas “deixaram” de ter risco, enquanto que outras “passaram” a ter risco, ficando a proporção final idêntica à anterior). Por último, a taxa de falsos positivos no subgrupo LES foi de 12,77%, não significativa quando comparada com a taxa de falsos positivos do grupo NAI ( $p=0,312$ )<sup>14</sup>.

14. Devido à diferença de dimensões entre as duas amostras (LES e NAI, em que a população LES representa apenas 0,10% da população NAI), bastariam apenas mais 3 casos de falsos positivos na população LES para que as diferenças encontradas fossem estatisticamente significativas.

**Quadro 37. Comparação de características da população LES e população NAI, e respectivo desempenho do rastreio**

	<b>Grupo NAI</b>	<b>Subgrupo LES</b>	<b>p</b>
<b>N</b>	<b>45.493</b>	<b>47</b>	
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,03 (27,71-35,74)	31,84 (28,22 – 35,00)	0,868
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	24,25 (21,94 – 27,77)	25,39 (21,71 – 30,26)	0,168
Idade Gestacional na altura do exame, semanas, mediana (IQR)	12,72 (12,36 – 13,12)	12,61 (12,40 – 13,06)	0,896
TN, mm, median (IQR)	1,80 (1,60 – 2,10)	1,80 (1,50 – 2,10)	0,554
PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	1,0025 (0,6858 – 1,4262)	0,9717 (0,5889 – 1,6383)	0,657
β-hCG livre, MoMs, mediana (IQR)	0,9944 (0,6761 – 1,5082)	1,4020 (0,8715 – 2,2895)	0,009**
Rastreios Positivos - risco basal (%)	23,06	19,15	0,496
Rastreios Positivos – risco combinado (%)	8,50	19,15	0,043*
Taxa de Falsos Positivos (risco combinado) (%)	7,85	12,77	0,312
Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR)	1:12 [8,32%]	1:2 [50,00 %]	0,043*

\* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Ainda no quadro 37. podemos verificar que o OAPR do subgrupo LES apresenta uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,043$ ) relativamente ao OAPR do grupo NAI, resultando num OAPR de 1:2 - ou seja, no subgrupo das grávidas com LES, por cada 2 grávidas que recebem indicação para fazerem exames invasivos (BVC ou amniocenteses) como resultado de um resultado de risco acrescido obtido na avaliação do rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre, 1 tem uma gravidez afectada (SD ou outra aneuploidia).

### **3.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA PORTUGUESA**

De uma amostra com um total de 3.173 casos, foram excluídos 51 casos por ausência de informação sobre o desfecho da gravidez (ausência de resultados de cariótipos). A amostra final estudada incluía um total de 3.122 gravidezes únicas, que fizeram o rastreio combinado do 1º trimestre.

Da amostra Portuguesa (Amostra PT) de 3.122 gravidezes únicas, caracteriza-se o grupo de 3.107 de mulheres grávidas que não apresentavam patologias autoimunes anteriores à gravidez (grupo NAI) e o grupo de 15 mulheres grávidas (0,48%) que à data do rastreio combinado eram portadoras de patologias autoimunes diagnosticadas (grupo AI). No quadro 38. podem observar-se as medianas populacionais para as variáveis maternas relevantes nos dois grupos.

**Quadro 38. Características das populações AI e NAI**

<b>Variável</b>	<b>Grupo NAI (n = 3.107)</b>	<b>Grupo AI (n = 15)</b>
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,04 (29,53 – 34,44)	31,43 (30,09 – 35,06)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	22,30 (20,50 – 24,62)	22,05 (20,40 – 25,50)
<b>Etnicidade (n (%))</b>		
Caucasiana	3043 (97,94)	15 (100,00)
Africana	39 (1,26)	0 (0,00)
Asiática de Leste	3 (0,10)	0 (0,00)
Asiática do Sul	15 (0,48)	0 (0,00)
Mista	7 (0,23)	0 (0,00)
<b>Tabagismo na gravidez (n (%))</b>		
	300 (9,66)	0 (0,00)
<b>Concepção (n (%))</b>		
Espontânea	3003 (96,65)	14 (93,33)
Terapêutica Ovulação	17 (0,55)	0 (0,00)
FIV	87 (2,80)	1 (6,67)
<b>Paridade (n (%))</b>		
Nulípara	1057 (62,99)	7 (46,67)
Múltipara	621 (37,01)	8 (53,33)
<b>História Médica (n (%))</b>		
Diabetes	3 (0,10)	0 (0,00)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>		
	38,86 (38,00 – 39,71)	37,86 (37,21 – 39,57)
<b>Peso ao nascer (gr), mediana (IQR)</b>		
	3150,0 (2860,0 – 3450,0)	3285,0 (2825,0 – 3577,5)

Da avaliação das características populacionais entre o grupo NAI e AI, não se verificam diferenças estatisticamente significativas nem nas variáveis maternas, nem quanto à única variável do recém-nascido que foi estudada (peso ao nascer). Encontra-se uma tendência para que a idade gestacional no parto seja inferior (AI-37,86 semanas) do que na população NAI. A população AI (n=15) é composta por 4 grupos com as patologias distribuídas de acordo com o quadro 39.

**Quadro 39. Patologias autoimunes na população portuguesa**

Patologia	N	Taxa de Incidência na População Global
Artrite Reumatóide	5	0,16 %
Síndrome Anti-Fosfolipídico	4	0,13 %
Doença Celíaca	2	0,06 %
Doença de Graves	1	0,03 %
Lúpus Eritematoso Sistémico	3	0,09 %
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>0,48 %</b>

Face à diminuta presença que cada uma das patologias autoimunes tinha na amostra global, não foi feito o estudo das características populacionais (maternas e do feto) para cada uma das doenças autoimunes isoladamente. No entanto, no quadro 39. podem ser observadas as diferentes patologias que compunham este pequeno grupo.

### 3.2.1 Avaliação dos marcadores ecográficos e bioquímicos

Depois da caracterização da amostra Portuguesa, procedeu-se à avaliação do marcadores ecográficos (CCC e TN) e bioquímicos ( $\beta$ -hCG livre e PAPP-A), comparando os grupos NAI e AI (ver quadro 40.).

**Quadro 40. Marcadores de 1º trimestre na população NAI e na população AI**

Variável	Grupo NAI (n = 3.107)	Grupo AI (n = 15)
Idade Gestacional na altura do exame, semanas, mediana (IQR)	12,71 (12,29 – 13,14)	12,71 (12,00 – 13,00)
<b>Marcadores Ecográficos</b>		
CCC, mm, mediana (IQR)	64,00 (58,80 – 69,30)	64,00 (55,30 – 67,70)
TN, mm, median (IQR)	1,60 (1,30 – 1,80)	1,50 (1,12 – 1,80)
<b>Marcadores Bioquímicos</b>		
PAPP-A, U/L, mediana (IQR)	3,95 (2,56 – 5,87)	3,17 (1,16 – 4,73)
PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	1,0194 (0,7198 – 1,4205)	0,8291 (0,6007 – 1,2486)
$\beta$ -hCG livre, U/L, mediana (IQR)	32,59 (22,75 – 50,12)	35,22 (21,12 – 48,84)
$\beta$ -hCG livre, MoMs, mediana (IQR)	0,9102 (0,6295 – 1,3476)	1,0062 (0,5689 – 1,0933)

Mais uma vez e de acordo com o que foi afirmado acima, provavelmente em virtude da diminuta dimensão do grupo AI, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos no que se refere aos marcadores ecográficos.

No que respeita aos marcadores bioquímicos, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nem nos parâmetros quantitativos, nem nas concentrações (U/L) quando convertidas os valores em MoM's. Apesar de se verificar uma tendência para um aumento de  $\beta$ -hCG livre, MoMs na população AI, esta não é significativa.

### 3.2.2 Avaliação dos indicadores de desempenho do rastreio Pré-Natal

**Quadro 41. Taxas de desempenho do rastreio pré-natal na população Portuguesa**

Medidas de desempenho	Amostra PT	Grupo NAI	Grupo AI	p
Taxa de Falsos Positivos (TFP)	3,14 %	3,15 %	0,00 %	-
Taxa de Falsos negativos (TFN)	0,06 %	0,06 %	0,00 %	-
Taxa de Verdadeiros Positivos (TVP)***	0,32 %	0,32 %	0,00 %	-
Taxa de Verdadeiros Negativos (TVN)	96,48 %	96,46 %	100,00 %	-
Valor Preditivo Positivo (VPP)	9,17 %	9,17 %	-	-
Valor Preditivo Negativo (VPN)	99,93 %	99,93 %	100,00 %	-
Taxa de Detecção (TD)****	83,33 %	83,33 %	-	-
Especificidade	96,85 %	96,83 %	100,00 %	-
Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR)	1 : 9,9 [10,10 %]	1 : 9,9 [10,10 %]	-	-

*TFP – Taxa de Falsos positivos; TFN – Taxa de Falsos negativos; TVP – Taxa de Verdadeiros positivos; TVN – Taxa de Verdadeiros negativos; VPP – Valor Preditivo positivo; VPN – Valor Preditivo negativo; TD – Taxa de detecção; \*\*\* Incidência da Trissomia 21; \*\*\*\* Sensibilidade ; OAPR - Probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (odds of being affected given a positive result).*

No quadro 41. as medidas de desempenho foram calculadas para um ponto de 1:300, constatando-se que a taxa de detecção da amostra PT (83,33%) foi sobreponível à do grupo NAI (83,33%). As especificidades da amostra global e do grupo NAI foram respectivamente de 96,85% e de 96,83%.

Do mesmo modo, também se observam ordens de grandeza sobreponíveis nas taxa de falsos

positivos na amostra PT (3,14%) e no grupo NAI (3,715%). No grupo AI não foi possível calcular a taxa de detecção, pois não foram encontrados verdadeiros positivos (TVP-0,00%) nem falsos negativos (TFN-0,00%).

O valor de OAPR foi totalmente sobreponível entre a amostra global e o grupo NAI. Pelas razões expostas acima, não se pôde calcular o valor de OAPR para o grupo AI.

### 3.3. VALORES NORMATIVOS

#### **3.3.1. Valores normativos para as variáveis bioquímicas (PAPP-A e $\beta$ -hCG livre) na população de gestantes portuguesas**

Um dos objectivos a que nos propusemos foi o de estabelecer valores normativos portugueses para os parâmetros bioquímicos do 1º trimestre, por semana gestacional. Tanto quanto é do nosso conhecimento os valores ainda não foram publicados.

Os programas de software de risco mais difundidos em Portugal, o Viewpoint e o Astraia, utilizam na sua base de dados, valores normativos emanados pela FME, entidade responsável pelo desenho, actualização e validação destes algoritmos. As populações utilizadas na formatação dessas bases de dados são europeias, pois resultam da variada informação veiculada pelos diversos centros, entidades e pessoas individuais, certificadas pela FME, que anualmente reportam resultados das diferentes variáveis constantes do algoritmo para a FME. O estudo dos valores normativos para os referidos parâmetros séricos do primeiro trimestre pretende conhecer e dar a conhecer as possíveis similitudes entre a amostra Portuguesa e a do Reino Unido (Quadro 42.)

**Quadro 42. Marcadores bioquímicos do rastreio do 1º trimestre na amostra Portuguesa (PT) estratificados por idade gestacional**

Idade Gestacional (Sem)	Marcadores Bioquímicos (PT)			
	PAPP-A, U/L, mediana (IQR)	PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	$\beta$ -hCG livre, U/L, mediana (IQR)	$\beta$ -hCG livre, MoMs, mediana (IQR)
11 (n=357)	2,61 (1,72 – 4,07)	1,0476 (0,7712 – 1,4733)	38,38 (26,59 – 57,52)	0,8701 (0,6399 – 1,2621)
12 (n=1708)	3,69 (2,43 – 5,29)	1,0240 (0,7055 – 1,4152)	34,78 (23,58 – 53,44)	0,9138 (0,6207 – 1,3719)
13 (n=1027)	4,96 (3,38 – 7,33)	1,0079 (0,7275 – 1,4070)	29,73 (20,10 – 43,24)	0,9268 (0,6354 – 1,3443)

### **3.3.2. Validação dos valores normativos da amostra portuguesa face à população do Reino Unido.**

Do estudo da amostra Portuguesa e da amostra do Reino Unido resulta o quadro 43. que descreve as diferentes características biofísicas, clínicas e obstétricas das duas amostras.

O IMC da amostra Portuguesa é inferior (22,30) ao IMC da amostrado Reino Unido (24,27), sendo a diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ). No que diz respeito à idade gestacional no parto, também se verifica uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ), sendo que a mediana da amostra Portuguesa é de 38,86 semanas e a do reino unido é de 40,05 semanas. Quanto ao peso ao nascer, também se observa uma diferença altamente significativa, sendo os recém nascidos da amostra Portuguesa menos pesados (3150 gr) que os do reino unido (3400 gr) ( $p < 0,001$ ) (Quadro 43.).

**Quadro 43. Características das amostras Portuguesa (PT) e do Reino Unido (RU)**

<b>Variável</b>	<b>Amostra PT (n=3.122)</b>	<b>Amostra RU (n =45.854)</b>
Idade Materna (anos), mediana (IQR)	32,04 (29,53 – 34,46)	32,04 (27,73-35,75)
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (IQR)	22,30 (20,50 – 24,60) ***	24,27 (21,94-27,77)
<b>Etnicidade (n (%))</b>		
Caucasiana	3058 (97,95)	32374 (70,60)
Africana	39 (1,25)	9207 (20,08)
Asiática de Leste	3 (0,10)	1002 (2,19)
Asiática do Sul	15 (0,48)	1973 (4,30)
Mista	7 (0,22)	1298 (2,83)
<b>Tabagismo na gravidez (n (%))</b>		
	300 (9,61)	3629 (7,91)
<b>Concepção (n (%))</b>		
Espontânea	3017 (96,64)	44241 (96,48)
Terapêutica Ovulação	17 (0,54)	732 (1,60)
FIV	88 (2,82)	881 (1,92)
<b>Paridade (n (%))</b>		
Nulípara	1064 (62,85)	22307 (48,65)
Múltipara	629 (37,15)	23547 (51,35)
<b>História Médica (n (%))</b>		
Diabetes	3 (0,10)	208 (0,45)
<b>Idade Gestacional no parto (sem), mediana (IQR)</b>	<b>38,86 (38,00 – 39,71) ***</b>	<b>40,05 (39,02-40,94)</b>
<b>Peso ao nascer (gr), mediana (IQR)</b>	<b>3150,0 (2860,0 – 3450,0) ***</b>	<b>3400,0 (3078,0-3722,0)</b>

\* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

No quadro 44. pode-se observar as variáveis ecográficas e bioquímicas das duas amostras. Da comparação ressalta que todas as variáveis, excepto as medianas do CCC e da PAPP-A, apresentam diferenças muito e altamente significativas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) quando comparadas com a amostra do Reino Unido. A mediana da idade gestacional da amostra Portuguesa é muito significativamente diferente, sendo inferior à da amostra do Reino Unido (PT-12,71

semanas; RU-12,72 semanas); a mediana da translucência da nuca (PT-1,60 mm; RU-1,80 mm) apresenta valores mais baixos, do que a mesma medida na amostra do Reino Unido. Ainda relativamente ao quadro 44., mas no que concerne aos valores dos parâmetros bioquímicos, verifica-se existir uma sobreposição das duas populações, aquando da conversão para MoM's, dos valores medianos da PAPP-A (PT-1,0187; RU-1,0021), sem diferenças significativas entre elas.

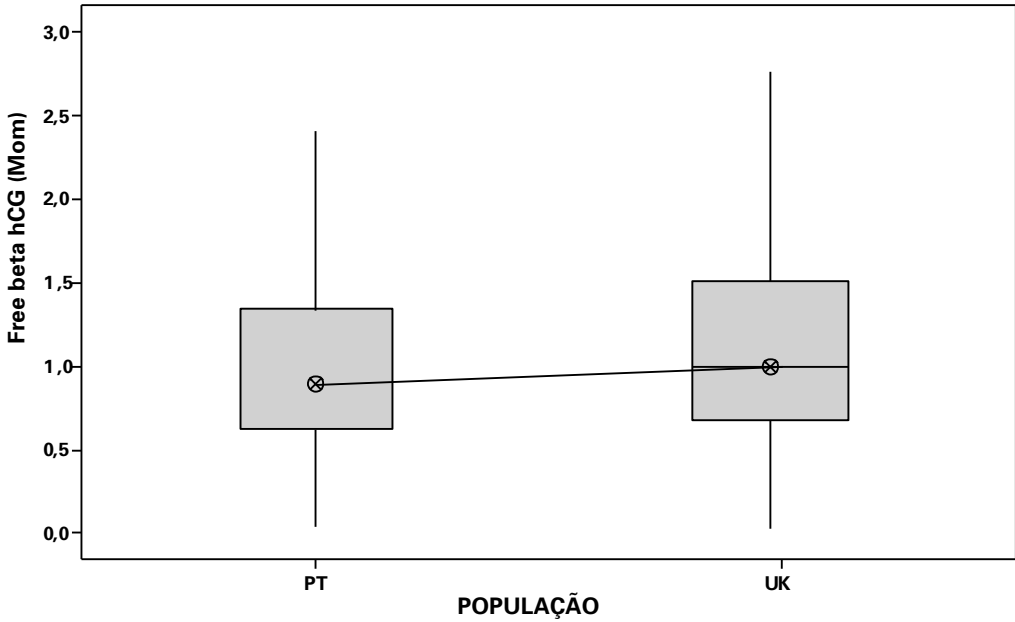
**Quadro 44. Marcadores de 1º trimestre na amostra Portuguesa (PT) e na amostra do Reino Unido (RU)**

Variável	Amostra PT (n = 3.122)	Amostra RU (n = 45.854)
Idade Gestacional na altura do exame, semanas, mediana (IQR)	12,71 (12,29 – 13,14) **	12,72 (12,36-13,11)
<b>Marcadores Ecográficos</b>		
CCC, mm, mediana (IQR)	64,00 (58,70 – 69,30)	63,50 (58,60-68,90)
TN, mm, median (IQR)	1,60 (1,30 – 1,80) ***	1,80 (1,60-2,10)
<b>Marcadores Bioquímicos</b>		
PAPP-A, U/L, mediana (IQR)	3,95 (2,55 – 5,87) ***	2,82 (1,79-4,42)
PAPP-A, MoMs, mediana (IQR)	1,0187 (0,7188 – 1,4204)	1,0021 (0,6855-1,4258)
β-hCG livre, U/L, mediana (IQR)	32,60 (22,75 – 50,04) ***	36,50 (24,30-56,30)
β-hCG livre, MoMs, mediana (IQR)	0,9105 (0,6284 – 1,3475) ***	0,9956 (0,6764-1,5094)

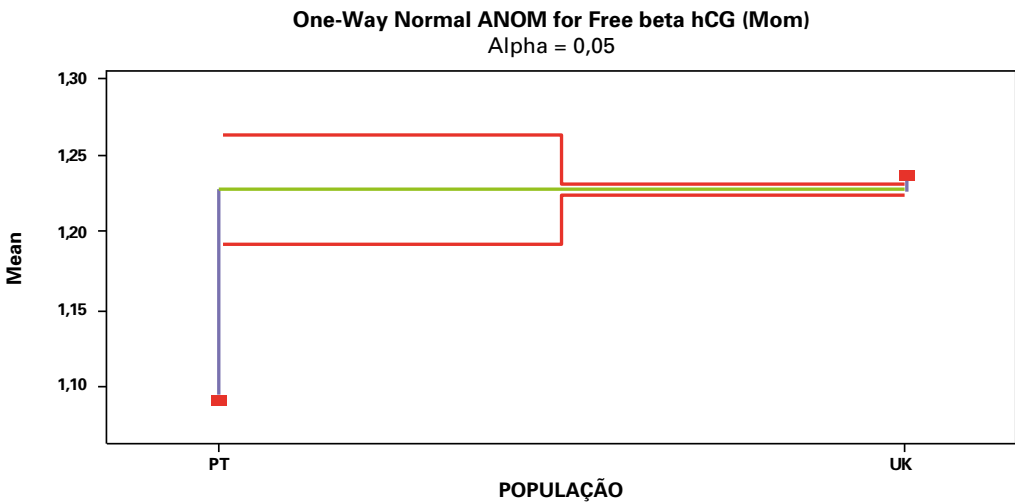
\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Por último, no que diz respeito às MoM's da β-hCG livre, encontramos uma diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ), sendo o valor da amostra Portuguesa inferior (0,9105) quando comparado como da amostra do Reino Unido (0,9956). Devido ao diferente número de casos das amostras em causa, a variância da amostra portuguesa é muito superior do que à do Reino Unido (Figura 11 e 12.).

**Figura 11.** Medianas de MoM's de  $\beta$ -hCG livre na população portuguesa e na população do Reino Unido



**Figura 12.** Análise de variância de MoMs de  $\beta$ -hCG livre na população portuguesa e na população do Reino Unido.





## CAPÍTULO 4

## Discussão

*Propusemo-nos a estudar o impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre. Dado que a amostra da população Portuguesa, pela previsível baixa prevalência das patologias autoimunes, poderia não ter poder estatístico suficiente para obter resultados fidedignos, optámos por recorrer ao maior centro europeu de investigação em Medicina Fetal, a Fetal Medicine Foundation-King's College (Londres). O registo de casos com que trabalhámos (45.854 casos) permitiu obter uma amostra de grávidas com doenças autoimunes de 361 casos. Relativamente à amostra colhida em Portugal, destinada ao estabelecimento de valores normativos para a população nacional, obteve-se uma dimensão de 3,122 casos.*

*Na discussão que se segue iremos abordar detalhadamente a amostra do Reino Unido, seguida da amostra Portuguesa, analisando criticamente os resultados obtidos à luz bibliografia disponível na literatura especializada.*

#### **4.1. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS DOENÇAS AUTOIMUNES NO RASTREIO PRÉ-NATAL COMBINADO DO 1º TRIMESTRE**

Tanto quanto é do nosso conhecimento, e de acordo com a literatura especializada disponível, a amostra do Reino Unido é a amostra populacional de grávidas mais alargada alguma vez estudada com o objectivo específico de avaliar o impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre.

A questão da dimensão da amostra é um aspecto particularmente relevante neste trabalho, dado que em estudos anteriores o baixo número de casos com doença autoimune pré-existente foi invariavelmente considerado uma limitação para a generalização dos resultados.

Como já referimos anteriormente, em 2007 foi reportada pela primeira vez a possível interferência do LES materno nos marcadores usados no rastreio combinado do primeiro trimestre para as aneuploidias, consubstanciada em níveis séricos significativamente aumentados de  $\beta$ -hCG livre(234). No entanto, face ao limitado poder estatístico do estudo (10 grávidas com LES pré-existente, numa população de 1150 gravidezes únicas), não foi possível detectar a eventual existência de diferenças significativas nas taxas de falsos positivos, antes ou depois do

rastreio combinado do primeiro trimestre. Refira-se que antes do estudo de Heinig já tinha sido ocasionalmente documentada a mudança dos níveis séricos de hCG total e  $\beta$ -hCG livre no rastreio do síndrome de Down no 2º e 3º trimestre de gestação de grávidas com doença autoimune(232,233,235,236), sem que o tópico fosse posteriormente desenvolvido através de investigação específica. Nestas circunstâncias, a dimensão da amostra do Reino Unido utilizada neste estudo poderá contribuir para acrescentar poder estatístico ao estudo pioneiro de Heinig, e assim ajudar a clarificar de forma mais fidedigna a influência do LES ou de outras patologias autoimunes nos níveis séricos de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A, efectuados no rastreio do primeiro trimestre, algo que ainda não foi avaliado consistentemente até ao momento actual.

No que se refere à amostra Portuguesa, apesar da casuística de dimensões razoáveis (3,122 casos), apenas foi possível considerar no estudo 15 casos de doenças autoimunes e 3 casos de LES. Apesar desta limitação, o seu estudo permitiu a obtenção de valores normativos, que serão comparados com a amostra do Reino Unido, numa perspectiva de validação dos mesmos.

#### **4.1.1 Análise crítica das variáveis biofísicas, clínicas e obstétricas**

Na amostra do Reino Unido de 45.854 gravidezes únicas, dividida entre grupo de doenças autoimunes (AI=361 casos) e grupo controlo sem doenças autoimunes (NAI=45.493 casos), encontrou-se uma diferença significativa na variável 'idade materna', mais elevada no grupo AI (33,11 anos) do que no grupo NAI (32,03 anos).

Detalhando por doença, a DC (33,50 anos), a CU (32,98 anos) e o subgrupo Outros (32,07 anos) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o SAF (34,85 anos) e a AR (34,07 anos) diferenças muito significativas ( $p < 0,01$ ), não se encontrando diferenças nas grávidas com EM e LES ( $n=47$ , 31.84 anos).

Estes achados, de um modo global, estão de acordo com os dados epidemiológicos que referem que a idade de início de algumas das doenças autoimunes (eg, AR, SS e SSc) se situa a partir dos 40-50 anos(30,55), pelo que o encontro entre o diagnóstico definitivo da doença e a gravidez obriga a que esta última seja obrigatoriamente tardia.

Nos casos do LES e da EM, cujas idades de início se encontram respectivamente nos escalões etários 15-40 anos e 20-30 anos, a gravidez ocorre mais habitualmente mais cedo, o que é congruente com a não existência no nosso estudo de diferenças significativas na idade materna relativamente ao grupo sem patologia AI. Por outro lado, se no passado era de certa maneira

desaconselhada a gravidez às mulheres com LES(99), actualmente a realidade é completamente distinta, fruto da melhor compreensão da fisiopatologia da doença e do estabelecimento de novos modelos de intervenção multidisciplinar(98,100), que vieram permitir um planeamento mais preciso da gravidez, de acordo com os períodos de remissão da doença(62).

Relativamente ao subgrupo SAF, que em cerca de 40 a 50% está associado a um diagnóstico anterior de LES, poder-se-ia esperar que não existissem também diferenças significativas na idade materna. No entanto, nesta patologia as diferenças foram altamente significativas ( $p < 0,01$ ), que pensamos poderem ser atribuídas à própria evolução natural do SAF, que é caracterizada por frequentes eventos obstétricos (abortos e perda fetal recorrente)(103), os quais poderão contribuir para uma ocorrência mais tardia da gravidez.

No subgrupo das DII, apesar da maior incidência ocorrer nos anos férteis e de as mulheres com DII não terem a sua fertilidade diminuída, quando comparadas com a população em geral(237), a justificação mais uma vez poderá residir na história natural destas doenças, em que a ocorrência frequente de complicações pós-cirúrgicas aumenta indirectamente o recurso aos métodos de reprodução medicamente assistida, com a consequente demora em engravidar(59,238).

Relativamente à amostra Portuguesa e no que diz respeito à idade materna, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo NAI e o grupo AI.

Passando agora à comparação da ‘idade gestacional à data do parto’ (medida em semanas), verificou-se que esta era significativamente menor ( $p < 0,01$ ) no grupo AI (mediana - 39,55) que no grupo controlo NAI (mediana - 40,05), acontecendo o mesmo com a variável ‘peso ao nascer’, significativamente menor no grupo AI.

Na amostra Portuguesa não foram encontradas diferenças significativas no que diz respeito à idade gestacional à data do parto nem relativamente ao peso ao nascer, apesar de a primeira destas variáveis apresentar uma ligeira tendência para ser mais baixa (AI-37,86 semanas) .

Detalhando por patologia, verifica-se que as diferenças mais significativas, tanto na idade gestacional no momento do parto como no peso ao nascer, foram encontradas na doença de Crohn, na AR e no LES. Estes achados reforçam a ideia de que, apesar dos inegáveis desenvolvimentos científicos e terapêuticos ocorridos nos últimos anos, a gravidez no LES continua a constituir uma condição não desprovida de risco(239), estando associada a significativa morbilidade fetal e neonatal(30).

Como se sabe, a gravidez em mulheres com doenças inflamatórias (eg, AR, LES, DII) está associada, em maior ou menor grau, a eventos perinatais adversos(228), nomeadamente a abortos, prematuridade, perturbações do crescimento fetal e morte fetal(36,101,112,124), que se pensa poderem resultar fisiopatologicamente de alterações imunológicas na placenta(98). Por seu lado, a prematuridade está associada no curto prazo a doença pulmonar crónica, lesão cerebral grave e sépsis neonatal, e no médio-longo prazo a doença cardiovascular, hipertensão, diabetes e obesidade(103,124).

A possibilidade da ocorrência, no momento da concepção ou no decurso da gestação, de eventos reconhecidos como factores de risco (e indicadores de mau prognóstico) tais como a exacerbação lúpica, a nefrite lúpica, as complicações hipertensivas e/ou PE e o SAF 2º, aumenta a probabilidade de aparecimento de complicações perinatais adversas, as quais são numericamente tão importantes como as decorrentes das aneuploidias(10,124,125).

Pelo exposto acima, a diferença muito significativa na idade gestacional no parto da grupo AI (e concretamente no subgrupo LES), e tendo em conta o intervalo de confiança de 37,68 – 40,25 semanas, poderá indicar que existe uma tendência para partos mais precoces, apesar de na amostra não se ter configurado a definição de prematuridade<sup>15</sup>.

No que diz respeito à AR, apesar da baixa casuística de co-ocorrência da gravidez(104), vários autores referem um risco aumentado de prematuridade e de perturbações do crescimento fetal nas grávidas com artrite inflamatória(62,110,111,124). Também no subgrupo AR os resultados não permitem configurar a definição de prematuridade nem de perturbações do crescimento.

No subgrupo SAF não foram encontradas diferenças quer na idade gestacional no parto, quer no peso ao nascer. Este aspecto é particularmente interessante, uma vez que o SAF não tratado está associado a uma taxa muito alta de aborto (até 90%), a pré-eclâmpsia, a RCF e a parto pré-termo(103). Com a introdução da aspirina de baixa dose (75-100 mg/d), com ou sem heparina de baixo peso molecular(10), estes eventos têm-se modificado, atingindo-se uma taxa de sucesso de 80% de nascimentos sem eventos adversos associados. Esta poderá ser a explicação dos resultados obtidos no nosso estudo, tendo em vista que as grávidas se encontravam em seguimento médico de acordo com as normas em vigor no Reino Unido.

---

15. *Recém-nascido prematuro (def. OMS) ou pré-termo: todo aquele que nasce antes da 37ª semana completa de gestação. Os recém-nascidos podem ser classificados em prematuros limiar, (entre 33 e 36 semanas de gestação ou peso ao nascer entre 1500 e 2500 gramas), prematuros moderados (entre as 28 e as 32 semanas de gestação ou peso ao nascer entre 1000 e 1500 gramas) ou em prematuros extremos (<28 semanas ou peso ao nascer abaixo dos 1000 gramas).*

No subgrupo DII e relativamente aos indicadores de resultados da gravidez, a idade gestacional no parto assim como o peso ao nascer, na DC apresentam diferença muito significativas. Apesar de muitas mulheres considerarem engravidar, continuam a ocorrer desfechos obstétricos adversos: vários autores referem que nestas doenças, mais do que a taxa de recidivas (que não apresenta diferenças para com a população geral), é o grau de actividade das doenças na altura da concepção, que define o seu curso e as complicações obstétricas(61,238,240), pelo que a gravidez tem de ser planeada para uma fase e remissão(237). Ter uma doença inflamatória intestinal e eventual história de cirurgia constitui forte predictor de desfecho adverso da gravidez (108): a doença de Crohn, caracterizada por uma inflamação intestinal crónica, está muitas vezes associada à má-nutrição, com repercussões importantes nas fases críticas do crescimento e diferenciação fetal. Existe, portanto, um risco acrescido, nas mulheres com doença de Crohn, de terem fetos com RCF(60).

#### **4.1.2 Análise crítica das variáveis ecográficas**

Na avaliação do marcadores ecográficos (CCC e TN) no 1º trimestre, encontraram-se diferenças significativas na idade gestacional à data do exame (AI-12,67 semanas e NAI-12,72 semanas), decorrentes da medição correctamente aferida do CCC (AI-62,80 mm e NAI-63,50 mm). O CCC dos fetos do grupo AI apresentou uma diferença significativa inferior a 1 mm (0,7 mm), relativamente ao grupo NAI.

Estes achados estão em consonância com os estudos de diversos autores (42,58,104,110) (36,101,112,241), que evidenciaram a ocorrência de perturbações do crescimento fetal (RCF e recém-nascidos de baixo peso, cerca de 22,3%) em mulheres com doenças autoimunes activa na gravidez. Este aspecto deve, aliás, ser levado em conta no momento da determinação ecográfica do CCC.

Relativamente a estas variáveis e entre os dois grupos da população portuguesa, não foi possível encontrar diferenças, face à insuficiente dimensão do grupo AI, como já foi realçado.

#### **4.1.3 Análise crítica das variáveis bioquímicas**

Neste ponto assentava um dos objectivos nucleares do nosso trabalho, mais concretamente o de conhecer a influência das doenças autoimunes (2ºobjectivo) nas MoM's individuais das grávidas, enquanto parâmetros utilizados no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre.

Como resultado mais importante, encontrou-se uma diferença muito significativa ( $p < 0,01$ ) nas MoM's da  $\beta$ -hCG livre do grupo AI (1,1030), quando comparadas com as MoM's do grupo NAI (0,9944).

Da avaliação dos diferentes subgrupos de doenças autoimunes destacou-se a do subgrupo do LES, com MoM's de 1,4020, correspondendo a uma diferença muito significativa ( $p < 0,01$ ). Os subgrupos da AR e da EM também apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), relativamente ao grupo de grávidas NAI.

Até à data, o aumento das MoM's da  $\beta$ -hCG livre no rastreio do 1º trimestre apenas tinha sido referido uma vez, numa amostra com 1150 gravidezes únicas, das quais 10 com LES pré-existente(234). Apesar das limitações metodológicas, e na ausência de resultados significativos, o autor deste estudo acabou por considerar o algoritmo do 1º trimestre apto para a execução do risco do 1º trimestre em doentes grávidas com LES. Os resultados do nosso estudo indiciam que a posição adoptada por Heinig pode não estar suficientemente fundamentada, devendo ser colocada a eventual necessidade de introdução de factores de correcção no algoritmo original, para as grávidas com doenças autoimunes em geral, e para o LES em particular.

Na amostra da população Portuguesa não foi possível observar a mesma diferença entre os grupos AI e NAI.

#### **4.1.4 Análise crítica dos indicadores de desempenho do rastreio Pré-Natal**

Partindo dos resultados obtidos no estudo das diferenças das MoM's da  $\beta$ -hCG livre no rastreio do 1º trimestre, prosseguimos no sentido de explorar o comportamento dos indicadores de desempenho do rastreio pré-natal na amostra do Reino Unido. O seu estudo assume a maior importância, se se considerar que num procedimento de rastreio se pretende identificar as gravidezes com risco suficiente para aneuploidias de modo a que lhes seja facultado aconselhamento genético e prescrição de testes diagnósticos adicionais. A exactidão dessa identificação, assim como a escolha da execução de testes invasivos, depende dos indicadores de desempenho dos testes de rastreio.

As medidas de desempenho utilizadas nos testes de rastreio, já definidas, são a sensibilidade ou taxa de detecção, a especificidade ou a sua medida inversa, a taxa de falsos positivos e ainda o OAPR. Estas medidas são função de vários factores, tais como a idade materna, o número de analitos medidos, a precisão do ensaio analítico, o método para estimar a idade gestacional, a

técnica para obter a medida da TN, a adequação dos dados de referência e os pontos de corte utilizados para determinar os resultados positivos ou de risco acrescido.

Embora os indicadores reportados nos quadros 31. e 32. (ver capítulo de Resultados) sejam exactamente os mesmos, no quadro 31. os cálculos foram efectuados considerando um ponto de corte de 1:300<sup>16</sup> (à data do exame), ao passo que no quadro 32. se considerou um ponto de corte de 1:100 (à data do exame). A utilização do ponto de corte de 1:100 teve como único propósito ser fiel ao ponto de corte utilizado na FME, onde se aplica um modelo contigente<sup>17</sup>.

A leitura de ambas as tabelas resulta idêntica, tendo-se encontrado uma diferença significativa ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) na taxa de falsos positivos entre o grupo AI (13,57% e 6,37%) e o grupo NAI (7,85% e 3,23%). Esta diferença, consistente para os dois pontos de corte (respectivamente 1:300 e 1:100), vem fundamentar o 3º objectivo do nosso trabalho: determinar se as doenças autoimunes podem condicionar um aumento da taxa de resultados falsos-positivos no rastreio combinado do 1º trimestre.

Das outras medidas de desempenho estudadas, destacamos a diferença altamente significativa para a TVN, tanto para o ponto de corte 1:300 como para o ponto de corte de 1:100, entre o grupo AI (83,38% e 90,58%) e o grupo NAI (91,38% e 95,99%). A especificidade também apresentou uma diferença muito significativa (AI-86,00%; NAI-92,09%) e (AI-93,43%; NAI-96,74%), mais uma vez nos dois pontos de corte (1:300 e 1:100, respectivamente), aliás de acordo com o aumento da taxa de falsos positivos que foi verificada.

Ainda nas medidas de desempenho, deixamos para o fim a discussão de dois indicadores cujos resultados merecem particular destaque: a TVP e o OAPR. No que se refere à TVP, os resultados obtidos no grupo AI (TVP=, 2,77%, idêntico para os dois pontos de corte), apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo NAI (0,65% e 0,60%, para os dois

---

16. As medidas obtidas na tabela 5 estão de acordo com as recomendações da Direcção Geral de Saúde, na sua Norma 023/2011, elaborada pela Comissão Técnica Nacional de Diagnóstico Pré-natal e revista em 21/5/2013. Esta Norma refere que devem ser utilizados testes cujas as taxas de detecção sejam de 85-95% para 5% de falsos positivos, para um ponto de corte consensual de 1/300. Deste modo aplicou-se à população do Reino Unido o ponto de corte aplicado em território Português por forma a que a possamos posteriormente estudar o seu comportamento face à população Portuguesa.

17. No primeiro estágio, aplica-se a todos os casos o rastreio combinado do primeiro trimestre (idade materna, TN,  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A) e utiliza-se um ponto de corte de 1 em 100, para definir as gravidezes com risco acrescido para aneuploidias e as que tiverem um risco mais baixo que 1 em 1000 são consideradas negativas. Um risco entre 1 em 101 e 1 em 1000 constitui um risco intermédio, o que ocorre em 15% do total das grávidas. Estas últimas devem prosseguir para um segundo estágio de rastreio com o ON, ductus venosus e regurgitação da tricúspide, que vai modificar o risco obtido no primeiro estágio. O ponto de corte neste segundo estágio é 1 em 100.

pontos de corte). Esta taxa sugere que a prevalência das aneuploidias no grupo AI foi significativamente mais elevada que no grupo NAI ( $p=0,014$  e  $p=0,012$ ).

Uma das possíveis explicações para esta ocorrência poderia estar relacionada com diferenças na idade materna. No quadro 33. (capítulo de Resultados) pode ser observado que a proporção de grávidas com mais de 35 anos (grupo de risco) na população AI é de 35,73%, significativamente superior ( $p=0,018$ ) à encontrada no grupo NAI (29,76%), sendo que esta última é por sua vez também superior à prevalência de nascimentos ocorridos acima dos 35 anos na amostra do Reino Unido<sup>18</sup> (2001-17,3%; 2008-20,1%; 2011-20,0%) (ver Quadro.2 do capítulo I).

Acresce que, como se pode observar no quadro 27. (capítulo de Resultados), a proporção de múltiparas é superior à proporção de nulíparas (múltiparas AI- 53,74: NAI-51,33; amostra RU-51,35), nomeadamente no grupo AI, pelo que todos os dados apontam para um risco acrescido de ocorrência de casos verdadeiros positivos de SD, associados à idade materna. No entanto, mais uma vez não é possível sustentar esta diferença com literatura científica já publicada.

Vejamos agora o indicador que nos fornece a probabilidade de estar afectado dado um resultado positivo (OAPR), o qual matematicamente se traduz na razão entre o nº de afectados e não afectados entre todos os resultados positivos. O OAPR é um importante indicador de desempenho, equivalente ao VPP, mas com a vantagem acrescida de permitir uma leitura mais clara do desempenho do teste, sobretudo para VPP elevados (Quadro 45.). Quanto mais próxima de 1 for o valor do OAPR, menos exames invasivos serão necessários executar para se encontrarem casos afectados.

**Quadro 45. Comparação dos indicadores de desempenho para os diferentes tipos de teste de rastreio**

	Ponto de corte (termo)	TD (%)	TFP (%)	OAPR
Teste Combinado	1:150	91	3	1:26
Teste Quadruplo	1:150	64	3	1:36
Teste sérico Integrado	1:150	80	3	1:29
Teste Integrado	1:150	93	3	1:25

*Adaptado de (242)*

18. A colheita da amostra do Reino Unido teve lugar entre Março 2006 e Janeiro de 2011.

No nosso estudo, podemos verificar que apesar de não se terem encontrado diferenças no VPP do grupo AI (16,95%) *versus* NAI (7,68%) ( $p=0,059$ ), encontrou-se um OAPR significativamente diferente ( $p=0,036$ ) nos dois grupos, passando de 1:12 (NAI) para 1:5 (AI).

No entanto, o sentido desta diferença e o OAPR encontrado para o grupo AI estão em desacordo com o resultado obtido de aumento da TFP (de 7,85% para 13,57%), porque face à elevada prevalência (TVP) de aneuploidias (2,77%) no grupo AI ( $p=0,014$ ), o cálculo encontra-se enviesado e apenas nos confirma a elevada prevalência encontrada.

A obtenção de um resultado positivo num teste de rastreio, em cujo objectivo reside a detecção de aneuploidias, constitui a indicação mais frequente para a execução de um teste diagnóstico invasivo(133,153). A taxa de falsos positivos encontrada irá aumentar os testes invasivos a executar, caso o casal aceite.

Por fim, detalhamos o valor da OAPR em ambos os pontos e corte, comparando o grupo AI com o NAI. Verifica-se no quadro 31. que o valor de OAPR é totalmente sobreponível entre a amostra do RU e grupo NAI, observando-se no entanto que no grupo AI o OAPR passa de 1:12 amostra RU e grupo NAI) para 1:5 (grupo AI), diferença essa que é significativa (Teste Binomial,  $p=0,036$ ) ou seja entre as grávidas com resultados de testes de rastreio com risco acrescido, 1 terá uma gravidez afectada, para cada 4 que não a terão, ou seja, em cada 5 exames invasivos apenas 1 terá uma gravidez afectada.

Na amostra do RU e no grupo NAI, terão de se fazer 12 testes invasivos para se encontrar um gravidez afectada. Porque o cálculo do OAPR resulta de uma razão entre os verdadeiros positivos e os falsos positivos, este resultado é concordante com os dados relativos à taxa de verdadeiros positivos (2,77%) e falsos positivos (13,57%), ambos aumentados na população AI (1:300). No quadro 32. são encontrados dados sobreponíveis aos do quadro 31., mas para o ponto de corte de 1:100.

Como conclusão deste ponto da discussão, salientamos que tendo sido encontrada no grupo AI uma taxa significativamente superior de falsos positivos ( $p=0,002$ ), se procurou investigar a existência de uma associação entre este aumento e um eventual aumento do número de exames invasivos<sup>19</sup>, recorrendo ao OAPR. No entanto, verificámos que, dada a elevada prevalência de aneuploidias no grupo AI, este indicador tem limitações importantes quando utilizado

---

19. *Definição de rastreio pré-natal: envolve a aplicação de testes não invasivos para a identificação de risco acrescido de anomalias congénitas. Os resultados dos testes de rastreio são necessariamente presuntivos, pelo que no caso de risco acrescido de aneuploidias deve ser colocada a indicação para realizar um teste diagnóstico.*

deste modo e para este fim. Assim, por forma a responder à 2ª parte do 3º objectivo (“*Saber se as doenças autoimunes podem condicionar um aumento da taxa de resultados falsos positivos, com consequente aumento do número de amniocenteses*”), teve de ser efectuado um outro procedimento, que consistiu no cálculo de um rácio entre as medianas das MoM’s da  $\beta$ -hCG livre e do PAPP-A dos grupos AI *versus* NAI. Neste cálculo, foram apenas utilizados os resultados de “risco acrescido” para aneuploidias, mas que se verificaram ser falsos positivos.

Utilizando este procedimento, o aumento dos MoM’s da  $\beta$ -hCG livre nos casos dos falsos positivos com “risco acrescido”, que já tínhamos comprovado anteriormente, ficou claramente reforçado pelos resultados obtido no cálculo do *ratio* das MoM’s  $\beta$ -hCG livre entre os grupos AI e NAI, e em particular nos resultados obtido no subgrupo de LES (*ratio* das medianas da MoM’s da  $\beta$ -hCG livre no grupo LES = 1,530). Ou seja, as MoM’s da  $\beta$ -hCG livre, nos falsos positivos do subgrupo LES são muito superiores do que as do grupo controlo. Deste resultado se pode inferir que no grupo AI poderão eventualmente ocorrer mais indicações para exames invasivos do que na população controlo, o que é congruente com o 3º objectivo do nosso estudo.

Por último, estudámos ainda os indicadores de desempenho (TFP e OAPR) no subgrupo de doentes com LES (*versus* o grupo NAI), de modo a determinar se este subgrupo, que apresentava os valores mais elevados de MoM’s de  $\beta$ -hCG livre, apresentava ou não uma TFP elevada.

Quando são considerados os valores das MoM’s no estabelecimento dos riscos positivos, na população NAI a bioquímica “corrige” ajustando o número de riscos positivos, diminuindo-os, enquanto que na população LES os riscos positivos mantêm-se, muito à custa dos falsos positivos, como pode ser observado pela taxa de falsos positivos nesta mesma população LES (12,77%). No entanto, comparada com a taxa de falsos positivos da população NAI, a diferença não é significativa ( $p=0,312$ ), provavelmente pela assimetria dos grupos. Com efeito, verificámos que bastariam apenas mais 3 casos de falsos positivos na população LES para que as diferenças encontradas fossem estatisticamente significativas.

#### **4.2 IMPACTO DAS DOENÇAS AUTOIMUNES NO RASTREIO PRÉ-NATAL COMBINADO DO 1º TRIMESTRE - PERSPECTIVA FISIOPATOLÓGICA**

Da análise crítica dos resultados obtidos, pensamos ter alcançado os objectivos a que nos propusemos no início deste trabalho, confirmando a hipótese de que as doenças autoimunes têm um impacto no rastreio pré-natal do 1º trimestre. No entanto, para além das implicações clínico-laboratoriais daqui decorrentes, é importante discorrer um pouco sobre os eventuais mecanismos fisiopatológicos implicados.

Tal como foi anteriormente referido, as doenças autoimunes apresentam uma prevalência acrescida no sexo feminino(4,9,15). Algumas doenças autoimunes, nomeadamente as chamadas doenças Th2, tais como o Lúpus Eritematoso Sistémico, têm tendência a agravar-se durante a gravidez(63,110,239,243). Tal como já foi realçado, o ambiente hormonal da gravidez é favorecedor da resposta Th2 interrompendo a resposta Th1(244). Outros factores, como a secreção da IL-10 pelo trofoblasto, concorrem para a protecção dos efeitos deletérios Th1(66). No entanto, sabe-se hoje que o sucesso da gravidez não depende apenas de uma resposta Th2 aumentada(73), mas sobretudo da sua condição de inflamação controlada(65,72).

A resposta imune materna na interface materno-fetal é assegurada pelo papel emergente das células dendríticas e pela indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), enzima intra-celular essencial para uma gravidez de sucesso(76,77,80), e que é um factor regulador da actividade das células Tregs, aumentando o seu fenótipo supressivo(15,63,75,89,90). Vários são os mecanismos IDO-dependentes que ocorrem quer no local de exposição ao antigénio fetal, quer sistemicamente e em paralelo, para sustentar a gestação(63) e prevenir a rejeição do feto(15,89,90,245).

Para além desta tolerância específica para antigénios fetais, a indução sistémica da IDO, durante a gravidez, resulta também em imunossupressão e tolerância imunológica materna de natureza transitória: as doenças autoimunes como a AR e a EM (dependentes das células Th1)(55,56)entram em remissão durante a gravidez, para só recidivarem após o parto. Ueno et al propõem que seja a hCG a hormona responsável pela protecção materna à autoimunidade(93). Molad et al(92) também é da mesma opinião, afirmando que a hCG, secretada pelo trofoblasto, induz a expressão da IDO. Voskuhl et al, no entanto, refere que os estrogénios também estão envolvidos na expressão aumentada de indolamina 2,3-dioxigenase(15).

As propriedades imunoreguladoras da hCG são conhecidas e incluem a modulação do equilíbrio Th1/Th2 e das respectivas citocinas(84) pela atracção dos Tregs para a interface materno-fetal(80) e pela estimulação das células dendríticas, que origina uma estimulação da classe II do CMH, da IL-10 e da expressão da IDO(84).

Está documentada a incapacidade associada ao LES activo de converter as células T CD25+FOXP3- em células T CD25+FOXP3+ (células Tregs)(39), fundamentais na tolerância transitória essencial para a implantação, sobrevivência e manutenção da gravidez(40,76-79).

O IDO representa ainda um importante passo evolutivo enquanto factor regulador da actividade das células Tregs, estabilizando e aumentando o fenótipo supressivo, impedindo assim a reprogramação das Treg em células T helper não-supressoras(91). A hCG constitui o primeiro sinal através do qual o embrião influencia profundamente a tolerância imunológica, no diálogo entre os sistemas imune e endócrino na interface materno-fetal. Se para o sucesso da implantação é necessário um endométrio receptivo, um blastocisto normal e um diálogo na interface maternal-fetal, para a progressão da gravidez é obrigatório a tolerância imunológica.

Vários destes factores encontram-se disfuncionais no lúpus eritematoso sistémico. Dentro das doenças autoimunes com maior prevalência no sexo feminino, o LES é a entidade com maiores implicações tanto na fertilidade (neste estudo, a proporção de grávidas na população AI que recorreu a tratamento de infertilidade foi superior ao da população controlo) como no desfecho da gravidez(63,110,115,239).

Neste contexto, não podemos afastar a possibilidade de existir uma relação de circularidade causal entre o impacto que a gravidez tem no agravamento do LES, e o impacto que este agravamento tem no desfecho da própria gravidez. Este processo de *outcome* potencialmente adverso poderá ser contrabalançado pelo aumento dos níveis de  $\beta$ -hCG livre, enquanto mecanismo de compensação imunomodulador, aumentando através do IDO as possibilidades de sucesso da gravidez nas portadoras de LES. Este mecanismo teria algumas analogias com aquilo que ocorre na vasculite placentar lúpica, em que a diminuição da perfusão intervilositária condiciona hipóxia placentar, originando um aumento da hCG como mecanismo compensador de migração vilositária(229,246). No entanto, no SAF as diferenças significativas entre grávidas AI e NAI, ocorrem para valores de  $\beta$ -hCG livre inferiores, mas não para valores superiores. Por esta razão não defendemos a possibilidade da hipóxia local condicionada por eventual vasculite placentar, estar na base deste mecanismo compensador de secreção da hCG (229,246).

### **4.3. IMPACTO DAS DOENÇAS AUTOIMUNES NO RASTREIO PRÉ-NATAL COMBINADO DO 1º TRIMESTRE - IMPLICAÇÃO CLÍNICA**

Do que foi dito, ficou evidenciado que o aumento da hCG em grávidas com doenças autoimunes condiciona uma TFP aumentada nessas mesmas doentes. Por sua vez, uma TFP aumentada condiciona uma taxa aumentada de indicações para testes invasivos(132). O aumento de indicação para testes invasivos numa população em que a maternidade é tardia, em que são efectuados tratamentos de fertilidade e em que ocorrem desfechos adversos da gravidez(62,98), associado ao facto de os testes invasivos estarem associados a um risco de 0,5-1% de perda fetal, faz com que as doenças AI, e em particular o LES, devam ser propostos como factores de correcção ao algoritmo de risco individual. Em termos estatísticos, pode contra-argumentar-se que a baixa prevalência do LES na população geral irá sempre condicionar um efeito pequeno no risco populacional. No entanto, o efeito sobre o risco individual de uma grávida pode ser substancial, e influenciar significativamente a decisão de efectuar, ou não, um teste invasivo(202).

### **4.4. VALORES NORMATIVOS**

Para além da avaliação do impacto das doenças autoimunes no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre, este trabalho também se propôs a estabelecer valores normativos Portugueses e de distribuição para as MoM's dos parâmetros séricos do primeiro trimestre, PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre, por semana de gestação.

Os valores normativos da população Portuguesa não estão reportados na literatura, pelo que, tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho em que os valores normativos foram especificamente determinados na população nacional.

#### **4.4.1. Valores normativos para as variáveis bioquímicas (PAPP-A e $\beta$ -hCG livre) na população de gestantes portuguesas**

Palomaki, num artigo de referência sobre padronização, boas práticas e recomendações em rastreio pré-natal, afirma que o laboratório de rastreio pré-natal deverá ter a preocupação de demonstrar que os dados incluídos no software de risco utilizado são apropriados para a população a ser rastreada(147).

De acordo com as boas práticas laboratoriais(247), cada laboratório deverá estabelecer/validar os seus próprios valores normativos. Para se atingirem as medidas de desempenho de acordo com as recomendações já referidas, são necessárias medianas exactas, fiáveis e específicas (tais como as medianas incluídas nos softwares de cálculo de risco que são obtidas pela “suavização” dos valores medianos observados por métodos de análise de regressão ponderada(248). Usando valores da mediana específicos para cada dia da gestação, as medidas de desempenho do rastreio irão melhorar, pelo que o seu uso no laboratório certificado de pré-natal deverá ser obrigatório(147).

No quadro 42., em que se encontram descritos os valores normativos para a Portuguesa, foram utilizadas mais de 100 amostras para cada semana gestacional completa, desde a 11ª até à 13ª, verificando-se que os valores de PAPP-A sérico materno aumentaram numa percentagem constante (25-30%), por semana, entre a 11ª e a 13ª semana completa; por seu lado, os valores de  $\beta$ -hCG livre diminuíram, no mesmo período, entre 10-20%, por semana gestacional completa(249).

#### **4.4.2. Validação dos valores normativos da população portuguesa face à população do Reino Unido.**

Da apreciação dos quadros 43. e 44. podemos constatar que a amostra Portuguesa e a do Reino Unido apresentam diferenças significativas. No quadro 43. as diferenças altamente significativas ( $p < 0,001$ ) são encontradas no IMC, sendo a amostra portuguesa menos pesada e menos obesa (PT-22,30 Kg/m<sup>2</sup> ; RU-24,27 Kg/m<sup>2</sup>), ainda que pela definição da OMS ambas as amostras devam ser consideradas como estando dentro dos parâmetros de normalidade(250); relativamente à idade gestacional no momento do parto, esta ocorre, na amostra Portuguesa, cerca de 1 semana mais cedo do que no RU ( $p < 0,001$ ).

Uma eventual explicação para estas diferenças pode residir na taxa de cesarianas em Portugal, que de acordo com a OMS é excessiva. O relatório da OMS de 2010 referente à sobre-utilização de cesarianas, reporta que Portugal teve uma taxa de 34% de cesarianas, em 2005 e 2008, para um intervalo ideal de 10-15%(251) Estes dados terão seguramente contribuído para a elaboração do despacho governamental nº 3482/2013, publicado em Março de 2013, que formalizou a criação da Comissão Nacional para a Redução da Taxa de Cesarianas. Naquele despacho é sublinhado que “...*Portugal é um dos países europeus com maior taxa de cesarianas (36.6%)... e que a OMS considera estes valores superiores ao aceitável*”.

Embora não tenhamos encontrado nenhum estudo, referente à população Portuguesa, que suporte a associação entre o aumento da taxa de cesariana e a diminuição da idade gestacional no parto, esses estudos existem noutros países, com destaque para o relatório do CDC (Center for Disease Control and prevention)(252). Neste relatório, está reportado um aumento de 60% (para todas as idades gestacionais) da taxa de cesarianas (em gravidezes únicas) entre 1996 (20,7%) e 2009 (32,9%), particularmente no período de termo precoce (37-38 semanas), em que a taxa aumentou de 20,6% (em 1996) para 33,6% (em 2009). Os relatórios da OMS e do CDC parecem fundamentar no excesso de cesarianas a diferença encontrada na idade gestacional Portuguesa quando comparada com a do Reino Unido, em que a taxa de cesarianas é de 22%.

O peso ao nascer está em consonância com o IMC materno, sendo os recém-nascidos menos pesados em Portugal do que no Reino Unido (PT-3150,0 gramas; RU-3400 gramas).

Se nos detivermos no quadro 44, apesar de não termos encontrado diferenças no CCC, encontramos diferenças muito significativas na idade gestacional da amostra Portuguesa (PT-12,71 semanas; RU-12,72 semanas). O CCC foi testado, tal como as restantes medidas, pelo teste de Mood e pelo teste t-Student, mas provavelmente devido à menor variância e intervalo interquartil (IQR) da mediana na amostra Portuguesa, não foram identificadas diferenças significativas. Quanto à idade gestacional, dado que o IQR da amostra Portuguesa é mais alargado do que o da amostra do Reino Unido, a diferença já é estatisticamente significativa (pelo teste t-Student e teste de Mood).

No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos, encontramos diferenças na PAPP-A que não se observam na sua conversão para MoM's. No parâmetro  $\beta$ -hCG livre, as diferenças encontradas foram altamente significativas ( $p < 0,001$ ), mantendo-se na conversão para MoM's. Os valores da  $\beta$ -hCG livre diminuem cerca 10-20% por cada semana gestacional completa(249), pelo que, como a idade gestacional da amostra Portuguesa era significativamente menor que a do Reino Unido, é possível que na conversão das concentrações da  $\beta$ -hCG livre da amostra Portuguesa para MoM's, estas sejam de menor valor que as obtidas no Reino Unido.

Este achado poderá dever-se ao facto de as MoM's serem obtidas utilizando como denominador a mediana da  $\beta$ -hCG livre (U/L) de idade gestacional inferior (para menos tempo gestacional), constituindo assim um modelo explicativo das MoM's resultantes da população Portuguesa serem inferiores à da amostra do Reino Unido.

Outro factor importante que tem de ser levado em conta para a eventual explicação da diferença encontrada nos valores bioquímicos da  $\beta$ -hCG livre, decorre do facto de ambos os marcadores mostrarem correlações directas com o peso materno(199): as concentrações séricas maternas, expressas em MoM's, do PAPP-A e da  $\beta$ -hCG livre, aumentam com o peso, podendo variar de 0,7 MoM aos 45 kg para 1,5 MoM num peso de 90 kg(196,199). No caso da amostra Portuguesa, como se descreveu acima, as diferenças altamente significativas ( $p<0,001$ ) que foram encontradas no IMC poderão ter concorrido para que as MoM's da  $\beta$ -hCG livre fossem mais baixas.

Outro factor que faz variar as MoM's da  $\beta$ -hCG livre é o tamanho do feto. A  $\beta$ -hCG livre aumenta com o CCC, por exemplo, para um aumento de CCC de 45 mm para 65 mm, pode corresponder um aumento de 0,8 para 1,2 MoM da  $\beta$ -hCG livre(199). Na amostra portuguesa, o menor tamanho médio dos fetos pode mais uma vez ter contribuído para as diferenças encontradas nos valores normativos.

Relativamente a outros factores de correcção (eg, etnia, tabagismo, concepção, paridade, história médica, CCC), merece ainda destaque a maior prevalência (sem ser significativa) de grávidas de etnia Africana e Asiática,, cujas concentrações de  $\beta$ -hCG livre são mais elevadas.

Quanto aos diferentes equipamentos (ambos certificados pela FMF) que foram utilizados na execução das amostras séricas das duas amostras populacionais (PT- Kryptor; RU-DELFIA), existem fortes correlações entre os resultados obtidos pelo Kryptor e pelo DELFIA(253), pelo que dificilmente constituirão a base para as diferenças encontradas entre as duas amostras populacionais.

Por último, é importante referir que os factores de correcção introduzidos no algoritmo de risco da FMF são factores de correcção para a população nele utilizada, pelo que seria importante poder calcular factores de correcção específicos e aferidos para a população Portuguesa. Na impossibilidade de o fazer, é aceitável que os laboratórios possam ajustar manualmente as suas medianas em 10%, se verificarem existir desvios sistemáticos nos seus valores de MoM's (recomendações de [www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)).

#### **4.4.3. Conclusão**

Este é o primeiro estudo que pretende estabelecer e comparar os valores normativos Portugueses. As amostras estudadas (PT e RU) não são totalmente sobreponíveis, como já foi detalhado. Face às diferenças encontradas reconhecemos a importância de repetir o mesmo estudo, mas com uma casuística superior na amostra nacional.

#### 4.5. LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS

À medida que ao longo desta discussão fomos discorrendo sobre as implicações dos resultados obtidos, nomeadamente no referente à verificação dos objectivos e da hipótese de trabalho, fomos em simultâneo apontando os diversos problemas, obstáculos e limitações com os quais nos deparámos, designadamente do ponto de vista metodológico.

Sabendo de antemão que nenhum estudo, por mais bem operacionalizado que se encontre, se pode reclamar como isento de limitações de um ou outro tipo, procurámos ainda assim diminuir o efeito de enviesamentos e factores confundentes, de modo a garantir, dentro das nossas possibilidades, um nível aceitável de segurança estatística no momento da interpretação dos resultados.

A primeira limitação surgiu imediatamente associada à questão nuclear da tese, e à hipótese em jogo: com efeito, como valorizar de forma ajustada os resultados alcançados, e interpretar adequadamente o seu significado, tanto na amostra do Reino Unido como na Portuguesa, quando não existia nenhum estudo publicado nesta matéria com uma amostra de dimensão significativa, com o qual pudéssemos aferir os nossos achados ?

Estreitamente ligada a esta, a segunda limitação prendeu-se exactamente com o tamanho da amostra. Apesar do nosso envolvimento profissional nesta área ter permitido obter uma amostra de dimensão assinalável em Portugal, a baixa prevalência das doenças autoimunes obrigou-nos a recorrer simultaneamente a uma amostra de muito maior dimensão. Felizmente, graças à colaboração iniciada há anos com a Fetal Medicine Foundation-King's College, pudemos contar com um centro de enorme reputação científica no campo do diagnóstico pré-natal, que nos disponibilizou a sua amostra de grávidas, com uma dimensão que em Portugal seria extremamente difícil de reunir e avaliar em tempo útil.

A terceira limitação decorreu da baixa prevalência de doenças autoimunes nas amostras, tanto do Reino Unido como Portuguesa, relativamente ao número total de elementos das duas amostras. Como é consensual, o grau de fidedignidade dos indicadores de desempenho diminui nas situações em que a patologia em análise tem uma baixa prevalência, pelo que a interpretação destes indicadores deverá ser feita com cuidados redobrados.



## CAPÍTULO 5

## Conclusões

As anomalias congénitas afectam aproximadamente 2% dos recém-nascidos, constituindo causas muito significativas de morbidade e mortalidade. Entre estas, a trissomia 21 é uma das causas mais frequentes de atraso mental, assim como de diversas alterações morfológicas.

As normas hoje em vigor recomendam que para avaliar o grau de risco para as aneuploidias mais prevalentes (T21, T13, T18), se recorra ao “Rastreio Combinado do 1º Trimestre”. As gravidezes cuja probabilidade de risco for acrescida na sequência deste rastreio deverão ser sujeitas a exames invasivos, tais como a biópsia das vilosidades coriônicas ou a amniocentese. Quanto mais qualidade existir num rastreio, menos falsos positivos existirão e menor o número de exames diagnósticos invasivos desnecessários.

As doenças autoimunes são doenças inflamatórias crónicas em cuja fisiopatologia se encontram distúrbios da imunidade humoral e celular, dependentes de factores genéticos, hormonais, psicológicos e ambientais. Atingem mais o sexo feminino e durante a idade fértil, podendo influenciar o *outcome* da gravidez e a saúde neonatal causando significativa morbidade e mortalidade.

O Lúpus Eritematoso Sistémico, para além de potencialmente afectado pelas alterações imunoendócrinas fisiológicas da gravidez, associa-se frequentemente a problemas de fertilidade. Recentemente, foi sugerido que as anormalidades ocorridas durante a invasão precoce do sinciotrofoblasto, resultando em deficiente diferenciação, deficiente maturação e diminuição na produção de hCG, poderão ser o mecanismo fisiopatológico primário para as perdas fetais no primeiro trimestre, nos doentes com SLE.

A ocorrência de níveis elevados de hCG total e  $\beta$ -hCG livre no rastreio para despiste de SD do segundo e do primeiro trimestre, em doentes com LES, foi assinalada episodicamente em alguns estudos, sem que daí se retirassem implicações relevantes de natureza clínico-laboratorial. Para além da escassez deste estudos, a pequena dimensão das amostras estudadas constituiu uma limitação significativa na fidedignidade dos resultados obtidos.

Para tal propusemo-nos a estudar uma população de grávidas de grande dimensão, que efectuaram o rastreio combinado do 1º trimestre de modo a poder encontrar, face à sua baixa prevalência, uma amostra de grávidas com doenças autoimunes.

Comparando os grupos com e sem doença autoimune, demonstrámos a existência de uma elevação das MoM's da  $\beta$ -hCG livre nas grávidas com doença autoimune, nomeadamente nos casos de lúpus eritematoso sistémico. O nosso estudo evidenciou ainda a importância da determinação de factores de correcção para os marcadores bioquímicos, aferidos às características da população testada.

Verificou-se existir um impacto das doenças autoimunes nas MoM's individuais da  $\beta$ -hCG livre do rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre, especialmente na EM, AR e LES. A presença de doenças autoimunes e de LES parece estar associado a uma taxa de falsos positivos aumentada para o despiste de aneuploidias, com potenciais consequências para a saúde fetal e materna.

Teorizámos sobre a possibilidade de na base destes resultados estarem envolvidos mecanismos imuno-moleculares diversos, entre os quais o equilíbrio Th1/Th2, a secreção de hCG, a expressão da IDO e os mecanismos imunoreguladores IDO-dependentes na interface materno-fetal.

Concluimos que o rastreio combinado do 1º trimestre certificado pela FMF deve continuar a ser aconselhado para as grávidas com doenças autoimunes, nomeadamente para as doentes com LES, mas que deverão ser calculados e introduzidos os devidos factores de correcção no algoritmo de risco, de modo a evitar a subida no número de resultados falso-positivos e correlatamente da utilização de métodos invasivos.

## Resumo

**Contexto:** As anomalias congénitas, com particular destaque para as aneuploidias, afectam aproximadamente 2% dos recém-nascidos, constituindo causas frequentes de morbilidade e mortalidade. Actualmente, a avaliação do grau de risco para as aneuploidias mais prevalentes (T21, T13, T18) é efectuada através do “Rastreio Combinado do 1º Trimestre”, devendo as grávidas com risco acrescido ser sujeitas a exames invasivos (ex. biópsia das vilosidades coriônicas, amniocentese). Quanto mais qualidade existir num rastreio, menos falsos positivos existirão e menor o número de exames diagnósticos invasivos desnecessários.

As doenças autoimunes são doenças inflamatórias crónicas em cuja fisiopatologia se encontram distúrbios da imunidade humoral e celular, dependentes de factores genéticos, hormonais, psicológicos e ambientais. Atingem mais o sexo feminino e durante a idade fértil, podendo influenciar o *outcome* da gravidez e a saúde neonatal causando significativa morbilidade e mortalidade. O lúpus eritematoso sistémico para além de potencialmente afectado pelas alterações imunoendócrinas fisiológicas da gravidez, associa-se frequentemente a problemas de fertilidade. Recentemente, foi sugerido que as anormalidades ocorridas durante a invasão precoce do sinciotrofoblasto, resultando em deficiente diferenciação, deficiente maturação e diminuição na produção de hCG, poderão ser o mecanismo fisiopatológico primário para as perdas fetais no primeiro trimestre, nos doentes com SLE.

A ocorrência de níveis elevados de hCG total e  $\beta$ -hCG livre no rastreio para despiste de síndrome de Down do segundo e do primeiro trimestre foi assinalada em grávidas portadoras de lúpus, mas a escassez de estudos comprovativos e a pequena dimensão das amostras estudadas constituiu uma limitação significativa na fidedignidade dos resultados obtidos.

**Objectivos:** O estudo teve como objectivos i. estabelecer valores normativos Portugueses e de distribuição para as MoM's dos parâmetros séricos do primeiro trimestre, por semana de gestação: (PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre), ii. avaliar a influência que as doenças autoimunes têm sobre as MoM's individuais dos parâmetros bioquímicos PAPP-A e/ou  $\beta$ -hCG livre, utilizados no rastreio pré-natal combinado do 1º trimestre, e iii. saber se as doenças autoimunes podem condicionar um aumento da taxa de resultados falsos positivos, com conseqüente aumento do número de amniocenteses.

**Metodologia:** Estudo longitudinal prospectivo, consistindo num rastreio pré-natal combinado de 1º trimestre para pesquisa de aneuploidias, em duas amostras provenientes do Reino Unido (n= 45,854) e de Portugal (n=3122). Foram avaliados parâmetros socio-demográficos, ecográficos, laboratoriais, e calculados os indicadores de desempenho do rastreio combinado. A execução analítica dos testes bioquímicos séricos (PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre) foi realizada no autoanalisador Brahms Kryptor e no autoanalisador 6000 Delfia Xpress. Compararam-se os grupos autoimune e não autoimune das amostras.

**Resultados:** Relativamente às características populacionais, o grupo auto imune tinha valores significativamente superiores nas variáveis idade materna e idade gestacional. Comparando os grupos com e sem doença autoimune, constatou-se a existência de uma elevação das MoM's da  $\beta$ -hCG livre nas grávidas com doença autoimune, nomeadamente nos casos de lúpus eritematoso sistémico.

**Conclusões:** os resultado obtidos reforçam a indicação do rastreio combinado do 1º trimestre certificado pela FMF nas grávidas com doenças autoimunes, nomeadamente para as doentes com LES; no entanto, devem ser calculados e introduzidos factores de correcção no algoritmo de risco, de modo a evitar a subida no número de resultados falso-positivos, e consequentemente a sobre- utilização de métodos invasivos.

## Summary

**Context:** Congenital anomalies, with particular reference to aneuploidias, affect approximately 2% of newborns, and are frequent causes of morbidity and mortality. Currently, the risk evaluation for the most prevalent aneuploidias (T21, T13, T18) is carried out through the “combined first trimester screening”, and pregnant women with increased risk are subjected to invasive tests (e.g. villus biopsy done, amniocentesis). The more quality exists in a screening, less false positives exists and fewer unnecessary invasive diagnostic exams. Autoimmune diseases are chronic inflammatory diseases in whose pathophysiology are immune humoral and cellular disorders, dependent on genetic factors, hormonal, psychological and environmental factors. The disease is more prevalent among females, during the child-bearing age, and may influence the outcome of pregnancy and neonatal health causing significant morbidity and mortality. Lupus Erythematosus in addition to potentially affected by immunoendocrine physiological changes of pregnancy, is often associated with fertility problems. Recently, it has been suggested that the abnormalities that occurred during the early invasion of the syncytiotrophoblast, resulting in insufficient differentiation, deficient maturation and decrease in production of hCG may be the primary pathophysiological mechanism for fetal losses in the first quarter, in patients with SLE. The occurrence of elevated levels of total hCG and free  $\beta$ -hCG in screening for Down’s syndrome of the second and first trimester was reported in pregnant women with lupus, but the paucity of supporting studies and the small size of the samples studied constituted a significant limitation on the trustworthiness of the results obtained.

**Objectives:** this study aims to i. establish normative values for the serum parameters MoM’s (PAPP-A and free  $\beta$ -hCG) and it’s distribution, in the first trimester, by week of pregnancy; ii. assess the influence that the autoimmune diseases have on the MoM’s of individual biochemical PAPP-A and/or  $\beta$ -hCG, used in antenatal screening combined for the first trimester, and iii. whether the autoimmune diseases may make an increased rate of false positives, with consequent increase in the number of amniocenteses.

**Methodology:** Prospective longitudinal study, consisting of a combined first trimester antenatal screening for aneuploidies lookup in two samples from the United Kingdom (n= 45.854) and Portugal (n= 3.122). Socio-demographic, echographic and laboratory parameters were evaluated, and combined screening performance indicators were calculated. The analytical run of serum biochemical tests (PAPP-A and  $\beta$ -hCG) was held at the Brahms Kryptor and in Delfia Xpress 6000. Comparisons between autoimmune group and non-autoimmune group were made.

**Results:** Relating to population characteristics, the autoimmune group had significantly different values in the variables maternal age and gestational age. Comparing the groups with and without autoimmune disease, it was noted that there is an elevation of the MoM's of free  $\beta$ -hCG levels in pregnant women with autoimmune disease, particularly in cases of systemic lupus erythematosus.

**Conclusions:** The results obtained reinforce the indication of FMF certified combined screening in pregnant women with autoimmune diseases, notably to the patients with SLE; However, correction factors should be calculated and entered in the risk algorithm, in order to avoid the rise in the number of false positive results, and consequently the over-use of invasive methods.

# Bibliografía

1. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 2001;345(5):340–50.
2. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental Triggers and Epigenetic Deregulation in Autoimmune Disease. *Discovery Medicine.* 2011;12(67):535–45.
3. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *Journal of Autoimmunity.* 2010 Apr 30;34(3):0–0.
4. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya J-M. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *Journal of Autoimmunity.* 2012 May;38(2-3):J109–19.
5. Jacobson DLD, Gange SJS, Rose NRN, Graham NMN. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Aug 31;84(3):223–43.
6. Eaton WWW, Rose NRN, Kalaydjian AA, Pedersen MGM, Mortensen PBP. Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *Journal of Autoimmunity.* 2007 Jul 31;29(1):9–9.
7. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute for Health. Autoimmune Diseases Coordinating Committee. US DOHAHS, editor. 2002 Dec 31;:1–83.
8. Cho JH, Gregersen PK, Feero WG, Gutmacher AE. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med. Mass Medical Soc;* 2011;365(17):1612–23.
9. Jørgensen KTK, Bo Vestergaard BV, Pedersen, Nielsen NMN, Jacobsen SS, Frisch MM. Childbirths and risk of female predominant and other autoimmune diseases in a population-based Danish cohort. *Journal of Autoimmunity.* 2012 Apr 30;38(2-3):J81–7.
10. Topic E. New Trends in Classification, monitoring and management of autoimmune diseases. IFCC, editor. 5th FESCC Continuous Post graduate Course in Clinical Chemistry. 2009 Jun 25;:1–95.
11. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010 Jan 1;11(1):7–13.
12. Wirnsberger G, Hinterberger M, Klein L. Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol.* 2011 Jan 1;89(1):45–53.
13. Tang QQ, Henriksen KJK, Boden EKE, Tooley AJA, Ye JJ, Subudhi SKS, et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003 Sep 30;171(7):3348–52.
14. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003 Aug;8(3):223–46.
15. Voskuhl R. Sex differences in autoimmune diseases. *Biol Sex Differ.* 2011.
16. Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T, et al. Constitutive ablation

of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med*. 2009 Mar 16;206(3):549–59.

17. Salomon BB, Lenschow DJD, Rhee LL, Ashourian NN, Singh BB, Sharpe AA, et al. B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity*. 2000 Mar 31;12(4):10–0.

18. Hori SS, Nomura TT, Sakaguchi SS. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.

19. Lohr J, Knoechel B, Kahn EC, Abbas AK. Role of B7 in T Cell Tolerance. *J Immunol*. 2004.

20. Kushwah R, Hu J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci*. 2011;1(1):20.

21. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212(1):8–27.

22. Curiel TJT. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2008 Mar 31;20(2):241–6.

23. Walker LSKL, Abbas AKA. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature Reviews: Immunology*. 2002 Jan 1;2(1):11–9.

24. James JA, Harley JB, Scofield RH. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Sep;18(5):462–7.

25. Mintzer DM, Billet SN, Chmielewski L. Drug-Induced Hematologic Syndromes. *Adv Hematol*. 2009 Jan 1;2009:1–11.

26. Brooks WHW, Le Dantec CC, Pers J-OJ, Youinou PP, Renaudineau YY. Epigenetics and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2010 Apr 30;34(3):0–0.

27. Qudus JJ, Johnson KJK, Gavalchin JJ, Amento EPE, Chrisp CEC, Yung RLR, et al. Treating activated CD4<sup>+</sup> T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest*. 1993 Jun 30;92(1):38–53.

28. Ballestar E. Epigenetics lessons from twins: prospects for autoimmune disease. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2010 Jul 31;39(1):30–41.

29. Wallace DCD. Bioenergetics and the epigenome: interface between the environment and genes in common diseases. *Dev Disabil Res Rev*. 2010 May 31;16(2):114–9.

30. Manzi SS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Managed Care*. 2001 Sep 30;7(16 Suppl):S474–9.

31. Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum. Dis. Clin. North Am*. 2002 Aug;28(3):561–77–vi–vii.

32. Boddaert J, Huong DLT, Amoura Z, Wechsler B, Godeau P, Piette J-C. Late-onset systemic lupus

- erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine*. 2004 Nov;83(6):348–59.
33. Symmons DPD. Frequency of lupus in people of African origin. *lupus*. 1995 May 31;4(3):176–8.
34. Shapira YY, Agmon-Levin NN, Shoenfeld YY. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Jul 31;6(8):468–76.
35. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *lupus*. 2006 May 1;15(5):308–18.
36. Dhar JP, Sokol RJ. Lupus and Pregnancy: Complex Yet Manageable. *Clinical Medicine & Research*. 2006 Dec 1;4(4):310–21.
37. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998 Oct;41(10):1714–24.
38. Isenberg D, Manzi S. *Systemic Lupus Erythematosus*. 2009.
39. Barreto M, Ferreira RC, Lourenço L, Moraes-Fontes MF, Santos E, Alves M, et al. Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGF  $\beta$  gene variants. *BMC Immunol*. 2009;10(1):5.
40. Tower C, Crocker I, Chirico D, Baker P, Bruce I. SLE and pregnancy: the potential role for regulatory T cells. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2010 Aug 24;7(2):124–8.
41. Tower C, Mathen S, Crocker I, Bruce IN. Regulatory T cells in Systemic Lupus Erythematosus and Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Feb 8;n/a–n/a.
42. Costenbader KHK, Feskanich DD, Stampfer MJM, Karlson EWE. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum*. 2007 Mar 31;56(4):1251–62.
43. Gill J, Quisel A, Rocca P, Walter D. Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus - American Family Physician. 2003 Dec 1;:1–8.
44. Tan EME, Cohen ASA, Fries JFJ, Masi ATA, McShane DJD, Rothfield NFN, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Nov 1;25(11):1271–7.
45. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep;40(9):1725–5.
46. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med. Arch Pathol Lab Med—Vol 124, January 2000; 2000*. pp. 71–81.
47. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J. Clin. Pathol*. 2000 Jun;53(6):424–32.
48. Wiik A, Cervera R, Haass M, Kallenberg C, Khamashta M, Meroni P, et al. European attempts

- to set guidelines for improving diagnostics of autoimmune rheumatic disorders. *lupus*. 2006 Jul 1;15(7):391–6.
49. Guidelines ACORAHCOSLE. Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. Rheumatology ACO, editor. *Arthritis & Rheumatism*. Lippincott-Raven Publishers. 1999 Sep 9;42:1785–96.
50. Wiik AS, Gordon TP, Kavanaugh AF, Lahita RG, Reeves W, van Venrooij WJ, et al. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr 15;51(2):291–8.
51. Graf J, Reichlin M. Antinuclear Antibodies. *Primer on the Rheumatic Diseases*, Arthritis Foundation. 12 ed. 2001 Jul 14;:1–2.
52. Asherson RAR, Galarza-Maldonado CC, Sanin-Blair JJ. The HELLP syndrome, antiphospholipid antibodies, and syndromes. *Clin Rheumatol*. 2008 Jan 1;27(1):1–4.
53. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, FitzGerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care & Research*. 2012 May 3;64(6):797–808.
54. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug 10;62(9):2569–81.
55. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V; 2009 Dec 7;:1–5.
56. Arnett FCE, Edworthy SMS, Bloch DAD, McShane DJD, Fries JFJ, Cooper NSN, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar 1;31(3):315–24.
57. Wiik AS, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. All you wanted to know about anti-CCP but were afraid to ask. *Autoimmunity Reviews*. 2010 Dec;10(2):90–3.
58. Rand JH. Molecular Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *Circulation research*. 2002.
59. Andres PGP, Friedman LSL. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1999 May 31;28(2):255–vii.
60. Fonager K, Sorensen H. Pregnancy Outcome for Women With Crohn’s Disease: A Follow-up Study Based on Linkage Between National Registries. Elsevier, editor. *The American Journal of Gastroenterology*. 1998 Jan 29;93(12):2426–30.
61. Mahadevan U, Sandborn W, Li D, Hakimian S, Kane S, Corley D. Pregnancy outcomes in women with inflammatory bowel disease: a large community-based study from Northern California. *Gastroenterology-Orlando*. 2007;133(4):1106–12.
62. Tincani A, Nuzzo M, Motta M, Lojacono A. Autoimmune diseases and pregnancy. *Hematology Meeting Reports (formerly Haematologica Reports)*. 2009;2(10):1–5.
63. Wan H. Immunoregulation of mononuclear phagocytic cells by human chorionic gonadotropin.

Eramus University Rotterdam, editor. Eramus University Rotterdam; 2008. pp. 1–156.

64. Billingham RER, Brent LL, Medawar PBP. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 2;172(4379):603–6.
65. Chaouat GG, Zourbas SS, Ostojic SS, Lappree-Delage GG, Dubanchet SS, Ledee NN, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J. Reprod. Immunol.* 2002 Jan 1;53(1-2):241–56.
66. Bakir WA, Abdul-gany ZS, Faeg A. The Role of IL-6, IL-10 and IFN- mRNA in Women with Recurrent Abortion. *Iraq Journal of Cancer and Medical Genetics*. Bagdad; 2010 Jul 25;3:46–53.
67. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. Plasmodium falciparum Induces a Th1/Th2 Disequilibrium, Favoring the Th1-Type Pathway, in the Human Placenta. *Journal of Infectious Diseases*. 2001 May 15;183(10):1530–4.
68. Munoz-Suano AA, Kallikourdis MM, Sarris MM, Betz AGA. Regulatory T cells protect from autoimmune arthritis during pregnancy. *Journal of Autoimmunity*. 2012 Apr 30;38(2-3):J103–8.
69. Forger F, Marcoli N, Gadola S, Möller B, Villiger PM, Ostensen M. Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2008 Jun 30;67(7):984–90.
70. Wegmann TGT, Lin HH, Guilbert LL, Mosmann TRT. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993 Jun 30;14(7):353–6.
71. Carp H. Cytokines in recurrent miscarriage. *lupus*. 2004 Sep 1;13(9):630–4.
72. Sargent ILI, Borzychowski AMA, Redman CWGC. NK cells and human pregnancy - an inflammatory view. *Trends Immunol.* 2006 Aug 31;27(9):6–6.
73. Chaouat GG. Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective. *J. Reprod. Immunol.* 2013 Mar 1;97(1):2–13.
74. Sacks, Studena, Sargent, Redman. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998 Jun 30;179(1):7–7.
75. Vacca P, Mingari MC. Natural killer cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*  
Volume 97, Issue 1 , Pages 14-19, March 2013. 2013. pp. 14–9.
76. Adcock EWE, Teasdale TT, August CSC, Cox SS, Meschia GG, Ballaglia TCT, et al. Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. *Science*. 1973 Aug 30;181(4102):845–7.
77. Han T. Inhibitory effect of human chorionic gonadotrophin on lymphocyte blastogenic response to mitogen, antigen and allogeneic cells. *Clin Exp Immunol.* 1974 Nov 30;18(4):529–35.
78. Saito S, Shima T, Inada K, Nakashima A. Which Types of Regulatory T cells Play Important Roles

- in Implantation and Pregnancy Maintenance? *Am J Reprod Immunol.* 2013 Feb 23;69(4):340–5.
79. Samstein RMR, Josefowicz SZS, Arvey AA, Treuting PMP, Rudensky AYA. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell.* 2012 Jul 5;150(1):29–38.
80. Schumacher A, Brachwitz N, Sohr S, Engeland K, Langwisch S, Dolaptchieva M, et al. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *The Journal of immunology.* 2009.
81. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 2004 May;10(5):347–53.
82. Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol. Hum. Reprod.* 2006 May;12(5):301–8.
83. Kliman HJH, Nestler JEJ, Sermasi EE, Sanger JM, Strauss JFJ. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology.* 1986 Mar 31;118(4):1567–82.
84. Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart J-M, Geenen V, Hauterive SPD. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* 2010 May;85(1):93–8.
85. Lopata AA, Hay DLD. The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Human Reproduction.* 1989 Nov 1;4(8 Suppl):87–94.
86. Hoshina MM, Boothby MM, Hussa RR, Pattillo RR, Camel HMH, Boime II. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta.* 1985 Mar 1;6(2):163–72.
87. Healy DLD, Okamoto SS, Morrow LL, Thomas AA, Jones MM, McLachlan VV, et al. Contributions of in vitro fertilization to knowledge of the reproductive endocrinology of the menstrual cycle. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1987 Feb 1;1(1):133–52.
88. Munn DHD, Zhou MM, Attwood JTJ, Bondarev II, Conway SJS, Marshall BB, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998 Aug 20;281(5380):1191–3.
89. Mellor ALA, Munn DHD. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today.* 1999 Sep 30;20(10):469–73.
90. Mellor ALA, Munn DHD. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews: Immunology.* 2004 Oct;4(10):762–74.
91. Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, Tregs and cancer. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(15):2240–6.
92. Molad Y, Borkowski T, Monselise A, Ben-Haroush A, Sulkes J, Hod M, et al. Maternal and fetal outcome of lupus pregnancy: a prospective study of 29 pregnancies. *lupus.* 2005;14(2):145–51.
93. Ueno A, Cho S, Cheng L, Wang J, Hou S, Nakano H, et al. Transient Upregulation of Indoleamine

- 2,3-Dioxygenase in Dendritic Cells by Human Chorionic Gonadotropin Downregulates Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 2007 Mar 27;56(6):1686–93.
94. Fujimoto AA, Osuga YY, Fujiwara TT, Yano TT, Tsutsumi OO, Momoeda MM, et al. Human chorionic gonadotropin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low late-midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2002 Dec 1;19(12):550–4.
95. Humaidan PP, Bungum LL, Bungum MM, Andersen CCY. Rescue of corpus luteum function with peri-ovulatory HCG supplementation in IVF/ICSI GnRH antagonist cycles in which ovulation was triggered with a GnRH agonist: a pilot study. *Reprod Biomed Online*. 2006 Jan 1;13(2):6–6.
96. Fatemi HMH, Popovic-Todorovic BB, Papanikolaou EE, Donoso PP, Devroey PP. An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Human Reproduction Update*. 2007 Jan 1;13(6):581–90.
97. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2305–13.
98. Doria A, Tincani A, Lockshin M. Challenges of lupus pregnancies. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jun;47 Suppl 3:iii9–12.
99. Friedman EA, Rutherford JW. Pregnancy and Lupus Erythematosus. *Obstetrics & Gynecology*. 1956 Nov 1;8(5):601.
100. Khamashta MA. Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Aug;20(4):685–94.
101. Yan Yuen S, Krizova A, Ouimet JM, Pope JE. Pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus (SLE) is improving: Results from a case control study and literature review. *Open Rheumatol J*. 2008;2:89–98.
102. Ostensen M, Brucato A, Carp H, Chambers C, Dolhain RJEM, Doria A, et al. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Mar 18;50(4):657–64.
103. Ornoy A, Chen L, Silver RM, Miller RK. Maternal autoimmune diseases and immunologically induced embryonic and fetoplacental damage. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol*. 2004. pp. 371–81.
104. Neri FF, Chimini LL, Filippini EE, Motta MM, Faden DD, Tincani AA. Pregnancy in patients with rheumatic diseases: psychological implication of a chronic disease and neuropsychological evaluation of the children. *lupus*. 2004 Jan 1;13(9):666–8.
105. Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman AJ. Does rheumatoid arthritis remit during pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the United Kingdom performed prospectively from late pregnancy. *Arthritis Rheum*. 1999 Jun;42(6):1219–27.
106. Buyon JPJ. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998 Mar 1;63(3):281–7.
107. Branch DW. Pregnancy in patients with rheumatic diseases: obstetric management and

monitoring. *lupus*. 2004 Jan 1;13(9):696–8.

108. Hench Ps. Effect of Jaundice on Chronic Infectious (Atrophic) Arthritis and on Primary Fibrositis further Observations; Attempts to Reproduce The Phenomenon. *Arch Intern Med*. 1938 Mar 1;61(3):451.

109. Østensen M, Khamashta M, Lockshin M, Parke A, Brucato A, Carp H, et al. Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. *Arthritis Res. Ther*. 2006;8(3):209.

110. Skomsvoll JF, Ostensen M, Irgens LM, Baste V. Obstetrical and neonatal outcome in pregnant patients with rheumatic disease. *Scand. J. Rheumatol. Suppl*. 1998;107:109–12.

111. Bowden AP, Barrett JH, Fallow W, Silman AJ. Women with inflammatory polyarthritis have babies of lower birth weight. *Journal Watch (General)*. 2001 Feb 1;28(2):355–9.

112. Surita FG de C, Parpinelli MA, Yonehara E, Krupa F, Cecatti JG. Systemic lupus erythematosus and pregnancy: clinical evolution, maternal and perinatal outcomes and placental findings. *Sao Paulo Med J*. 2007 Mar 1;125(2):91–5.

113. Lockshin MD, Reinitz E, Druzin ML, Murrman M, Estes D. Lupus pregnancy. Case-control prospective study demonstrating absence of lupus exacerbation during or after pregnancy. *Am. J. Med*. 1984 Nov;77(5):893–8.

114. Urowitz MB, Gladman DD, Farewell VT, Stewart J, McDonald J. Lupus and pregnancy studies. *Arthritis Rheum*. 1993 Oct;36(10):1392–7.

115. Ruiz-Irastorza G, Lima F, Alves J, KHAMASHTA MA, Simpson J, Hughes GR, et al. Increased rate of lupus flare during pregnancy and the puerperium: a prospective study of 78 pregnancies. *Br. J. Rheumatol*. 1996 Feb;35(2):133–8.

116. Cavallasca JA. Progress in Systemic Lupus Erythematosus Research - Tomas I. Seward - Google Books. Progress in Systemic Lupus Erythematosus Research. Nova Science Publishers. 2008;;9–15.

117. Doria AA, Cutolo MM, Ghirardello AA, Zampieri SS, Vescovi FF, Sulli AA, et al. Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr 14;47(2):202–9.

118. Ruiz-Irastorza GG, Khamashta MAM, Gordon CC, Lockshin MDM, Johns KRK, Sammaritano LL, et al. Measuring systemic lupus erythematosus activity during pregnancy: validation of the lupus activity index in pregnancy scale. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb 15;51(1):78–82.

119. Kiss E, Bhattoa HP, Bettembuk P, Balogh A, Szegedi G. Pregnancy in women with systemic lupus erythematosus. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002 Mar 10;101(2):129–34.

120. De Bandt M, Palazzo E, Belmatoug N, M'Bappe P, Hayem G, Kahn ME, et al. [Outcome of pregnancies in lupus: experience at one center]. *Ann Med Interne (Paris)*. 2000 Mar;151(2):87–92.

121. Mintz GG, Niz JJ, Gutierrez GG, Garcia-Alonso AA, Karchmer SS. Prospective study of pregnancy in systemic lupus erythematosus. Results of a multidisciplinary approach. *Journal Watch (General)*. 1986 Jul 31;13(4):732–9.

122. Soubassi LL, Haidopoulos DD, Sindos MM, Pilalis AA, Chaniotis DD, Diakomanolis EE,

- et al. Pregnancy outcome in women with pre-existing lupus nephritis. *J Obstet Gynaecol.* 2004 Aug 31;24(6):630–4.
123. Wong KLK, Chan FYF, Lee CPC. Outcome of pregnancy in patients with systemic lupus erythematosus. A prospective study. *Arch Intern Med.* 1991 Feb 1;151(2):269–73.
124. Branch DW. Autoimmunity and pregnancy loss. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1990 Sep 19;264(11):1453–4.
125. Fausett MB, Branch DW. Autoimmunity and Pregnancy Loss. *Semin Reprod Med.* Copyright © 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: +1(212) 584-4662; 2000;18(04):379–92.
126. Bertsias G, Ioannidis JPA, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann. Rheum. Dis.* 2008 Feb 1;67(2):195–205.
127. Mavragani C, Ioannidis J, Tzioufas A, Hantoumi I, Moutsopoulos H. Recurrent pregnancy loss and autoantibody profile in autoimmune diseases. *Rheumatology.* 1999;38(12):1228.
128. Kari JA. Pregnancy outcome in connective tissue diseases. *lupus.* 2001;22:447–51.
129. Carmona FE, Font JJ, Cervera RR, Muñoz FE, Cararach VV, Balasch JJ. Obstetrical outcome of pregnancy in patients with systemic Lupus erythematosus. A study of 60 cases. *European Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1999 Mar 31;83(2):137–42.
130. Skomsvoll JFJ, Baste VV, Irgens LML, Østensen MM. The recurrence risk of adverse outcome in the second pregnancy in women with rheumatic disease1. *Obstetrics & Gynecology.* 2002 Dec 1;100(6):1196–202.
131. D'Alton ME, Cleary-Goldman J. Additional Benefits of First Trimester Screening. *Semin Perinatol.* 2005 Dec;29(6):405–11.
132. Nicolaides K. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment - Nicolaides - 2011 - *Prenatal Diagnosis* - Wiley Online Library. *Prenat. Diagn.* 2011.
133. Eurocat. Eurocat PNScreeningPolicies. 2010 Apr pp. 1–34.
134. Khoshnood B, Greenlees R, Loane M, Dolk H, on behalf of the EUROCAT Project Management Committee and a EUROCAT Working Group. Paper 2: EUROCAT public health indicators for congenital anomalies in Europe. Boyd P, Haeusler M, Barisic I, editors. *Birth Defect Res A.* 2011 Mar 4;91(S1):S16–S22.
135. Vraneković JJ, Božović IBI, Grubić ZZ, Wagner JJ, Pavlinić DD, Dahoun SS, et al. Down syndrome: parental origin, recombination, and maternal age. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012 Jan 1;16(1):70–3.
136. Resta RG. Changing demographics of advanced maternal age (AMA) and the impact on the predicted incidence of Down syndrome in the United States: Implications for prenatal screening and genetic counseling. *Am. J. Med. Genet. A.* 2005 Feb 15;133A(1):31–6.

137. Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007 Feb 15;145C(1):18–32.
138. Neri G, Opitz JM. Down syndrome: Comments and reflections on the 50th anniversary of Lejeune's discovery. *Am. J. Med. Genet. A.* 2009 Dec 1;149A(12):2647–54.
139. Biselli J, Goloni-Bertollo E, Ruiz M, Pavarino-Bertelli É. Cytogenetic profile of Down syndrome cases seen by a general genetics outpatient service in Brazil. *Down Syndrome Research and Practice (Online).* Down Syndrome Education International; 2008.
140. Walsh J. Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing. *CTAF Californian Technology Assessment Forum*; 2012 Dec.
141. Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen.* 2002;9(1):2–6.
142. Nicolaides KH, Sebire NJ, Snijders RJM. *The 11-14-Week Scan.* Parthenon Publishing; 1999.
143. Kevin Spencer, Natasha Tul and Kypros H. Nicolaides. Maternal serum free •  $\beta$ -hCG and PAPP-A in fetal sex chromosome defects in the first trimester. *Prenat Diagn* 2000; 20: 390±394.
144. Wald NJN. What are we screening for? *J Med Screen.* 1994 Sep 30;1(4):205–5.
145. Weisz B, Rodeck CH. An update on antenatal screening for Down's syndrome and specific implications for assisted reproduction pregnancies. *Human Reproduction Update.* 2006 Sep 1;12(5):513–8.
146. Wald NJN. Guidance on terminology. *J Med Screen [Internet].* 2008 Jan 1;15(1):50–0. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0969-1413&volume=15&issue=1&spage=50>
147. Palomaki GE, Lee JES, Canick JA, Mcdowell GA, Donnenfeld AE. Technical standards and guidelines: Prenatal screening for Down syndrome that includes first-trimester biochemistry and/or ultrasound measurements. *Genetics in Medicine.* 2009 Sep 1;11(9):669–81.
148. ACOG. Screening for Birth Defects. *American College of Obstetricians and Gynecologists.* 2011 Aug 1;:1–2.
149. National Institute for Health and Clinical Excellence (Great Britain). *Antenatal Care.* 2008. pp. 1–454.
150. Ferreira L. *Direção-Geral da Saúde.* 2001 Mar 9;:1–4.
151. Papaioannou GI, Syngelaki A, Poon LCY, Ross JA, Nicolaides KH. Normal Ranges of Embryonic Length, Embryonic Heart Rate, Gestational Sac Diameter and Yolk Sac Diameter at 6–10 Weeks. *Fetal Diagn Ther.* 2010;28(4):207–19.
152. ISUOG. ISUOG Practice Guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012 Dec 25;41(1):102–13.
153. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat. Diagn.* John Wiley & Sons, Ltd; 2011;31(1):7–15.

154. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ*. 1992 Apr 4;304(6831):867–9.
155. Carr S, Wolfe H, Dukes K. First-Trimester or Second-Trimester Screening, or Both, for Down's Syndrome — *NEJM*. *N. Engl. J. Med.* 2005;353.
156. Rosen T, D'Alton ME. Down Syndrome Screening in the First and Second Trimesters: What Do the Data Show? *Semin Perinatol.* 2005 Dec;29(6):367–75.
157. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw AK, McGuire A. Antenatal screening for Down's syndrome. *Health Technology Assesment* 1998; 1998;Vol2:No1. 1998 Apr 21;:1–124.
158. Nicolaides KH, De Figueiredo D. The 11-13(+6) weeks scan. Fetal Medicine Foundation, editor. 2004. pp. 1–118.
159. Nice-Uk. National Institute for Health and Clinical Excellencecentre for Clinical Practice. 2011 Mar 4;:1–48.
160. Committee UNS, Health DO. Fetal Anomaly Screening Programme - Screening for Down's Syndrome: UK NSC Policy recommendations 2007 – 2010: Model of Best Practice. SAGE Publications; 2010;1(8):579–88.
161. Ferreira Vicente L, Castela E, Matias A, Correia H, Correia J, Cascais MJ. Exames ecográficos na Gravidez. 2011 Sep 29;:1–12.
162. Matias A, Castela E, Correia H, Correia J, Saraiva J, Pombeiro J, et al. Norma da Direcção Geral da Saúde. de Saúde DG, PT MDS, editors. 2013 May pp. 1–8.
163. Larsen SO, Christiansen M, Nørgaard-Pedersen B. Calculation of roc curves in multidimensional likelihood ratio based screening with Down's syndrome as a special case. *J Med Screen.* 1998 May 31;5(2):57–62.
164. Barrett SL, Bower C, Hadlow NC. Use of the combined first-trimester screen result and low PAPP-A to predict risk of adverse fetal outcomes. *Prenat. Diagn.* 2008;28(1):28–35.
165. Spencer KK, Cowans NJN, Molina FE, Kagan KOK, Nicolaides KHK. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Feb 1;31(2):147–52.
166. Spencer K, Yu CKH, Cowans NJ, Otigbah C, Nicolaides KH. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat. Diagn.* 2005 Oct;25(10):949–53.
167. Spencer K, Cowans NJ, Avgidou K, Molina F, Nicolaides KH. First-trimester biochemical markers of aneuploidy and the prediction of small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;31(1):15–9.
168. Ong CYT, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH. First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* Blackwell Publishing Ltd; 2000 Oct;107(10):1265–70.

169. Haram K, Sjøfteland E, Bukowski R. Intrauterine growth restriction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2006 Apr;93(1):5–12.
170. Kjell Haram, Svendsen E, Myking O. Growth Restriction: Etiology, Maternal and Neonatal Outcome. *Current Women's Health Reviews*. 2007 Jul 3;3:145–60.
171. Holmes RPR, Soothill PWP. Intra-uterine growth retardation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 1996 Mar 31;8(2):148–54.
172. Tan TYT, Yeo GSH. Intrauterine growth restriction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2005 Mar 31;17(2):135–42.
173. Lin CCC, Santolaya-Forgas JJ. Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstetrics & Gynecology*. 1998 Dec 1;92(6):1044–55.
174. Steer P. The epidemiology of preterm labour - Steer - 2005 - *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* - Wiley Online Library. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & ...* 2005.
175. Bovicelli L, Orsini LF, Rizzo N, Calderoni P, Pazzaglia FL, Michelacci L. Estimation of gestational age during the first trimester by real-time measurement of fetal crown-rump length and biparietal diameter. *J Clin Ultrasound*. 1981 Feb;9(2):71–5.
176. Robinson HP, Fleming JE. A critical evaluation of sonar “crown-rump length” measurements. *Br J Obstet Gynaecol*. 1975 Aug 31;82(9):702–10.
177. Atzei A, Gajewska K, Huggon I. Relationship between nuchal translucency thickness and prevalence of major cardiac defects in fetuses with normal karyotype - Atzei - 2005 - *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* - Wiley Online Library. ... in *Obstetrics and ...* 2005.
178. Comstock CH, Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Saade GR, Berkowitz RL, et al. Is there a nuchal translucency millimeter measurement above which there is no added benefit from first trimester serum screening? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006 Sep;195(3):843–7.
179. Spencer K, Ong C, Skentou H, Liao AW, Nicolaides KH. Screening for trisomy 13 by fetal nuchal translucency and maternal serum free b-hCG and PAPP-A at 10±14 weeks of gestation. *Prenat. Diagn*. 2000;20:411–6.
180. Gall SAS, Halbert SPS. Antigenic constituents in pregnancy plasma which are undetectable in normal non-pregnant female or male plasma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1971 Dec 31;42(4):503–15.
181. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Hormone & IGF Research*. 2007 Feb;17(1):10–8.
182. Conover CA. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Ltd; 2012 May 1;23(5):242–9.
183. Costa SL, Proctor L, Dodd JM, Toal M, Okun N, Johnson JA, et al. Screening for Placental Insufficiency in High-risk Pregnancies: Is Earlier Better? *Placenta*. 2008 Nov 19;29(12):1034–40.
184. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM, et al. First and second

- trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess.* 2003;7(11):1–77.
185. Bindra RR, Curcio PP, Cicero SS, Martin AA, Nicolaides KHK. Uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation in chromosomally abnormal fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001 Dec 1;18(6):587–9.
186. Poon LC, Kametas NA, Maiz N, Akolekar R, Nicolaides KH. First-Trimester Prediction of Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Hypertension.* 2009 May 1;53(5):812–8.
187. Murphy VE, University of Newcastle (N.S.W.). School of Medical Practice and Population Health. The effect of maternal asthma during pregnancy on placental function and fetal development. 2004.
188. Jones R, Stoikos C, Findlay J, Salamonsen L. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 2006 Jul 26;132(2):217–32.
189. Rockwell LC, Vargas E, Moore LG. Human physiological adaptation to pregnancy: inter- and intraspecific perspectives. *Am. J. Hum. Biol.* 2003 May;15(3):330–41.
190. Lyall E, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A, Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am. J. Pathol.* 2001 May;158(5):1713–21.
191. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein Hormones: Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1981 Jun;50(1):465–95.
192. Kliman HJ. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am. J. Pathol.* 2000 Dec;157(6):1759–68.
193. Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2008 Jun;294(6):C1313–22.
194. Pandya P, Wright D, Syngelaki A, Akolekar R, Nicolaides KH. Maternal Serum Placental Growth Factor in Prospective Screening for Aneuploidies at 8–13 Weeks' Gestation. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(2):87–93.
195. Zaragoza E, Akolekar R, Poon LCY, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks in chromosomally abnormal pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Apr;33(4):382–6.
196. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 May 1;31(5):493–502.
197. Cuckle HSH, Wald NJN, Thompson SGS. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987 Apr 30;94(5):387–402.
198. Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003;21(4):313–21.

199. Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* John Wiley & Sons, Ltd; 2009 Jul;34(1):14–8.
200. Sahota DS, Leung TY, Fung TY, Chan LW, Law LW, Lau TK. Medians and correction factors for biochemical and ultrasound markers in Chinese women undergoing first-trimester screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Apr 1;33(4):387–93.
201. Krantz DAD, Hallahan TWT, Macri VJV, Macri JNJ. Maternal weight and ethnic adjustment within a first-trimester Down syndrome and trisomy 18 screening program. *Prenat. Diagn.* 2005 Jul 31;25(8):635–40.
202. Spencer KK, Heath VV, El-Sheikhah AA, Ong CYTC, Nicolaides KHK. Ethnicity and the need for correction of biochemical and ultrasound markers of chromosomal anomalies in the first trimester: a study of Oriental, Asian and Afro-Caribbean populations. *Prenat. Diagn.* 2005 Apr 30;25(5):365–9.
203. Niemimaa M, Heinonen S, Seppala M, Ryyanen M. The influence of smoking on the pregnancy-associated plasma protein A, free beta human chorionic gonadotrophin and nuchal translucency. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 2003 Jul;110(7):664–7.
204. Kagan KOK, Frisova VV, Nicolaides KHK, Spencer KK. Dose dependency between cigarette consumption and reduced maternal serum PAPP-A levels at 11-13+6 weeks of gestation. *Prenat. Diagn.* 2007 Aug 31;27(9):849–53.
205. Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat. Diagn.* 2008 Jan 1;28(1):49–52.
206. Spencer K, Cowans NJ, Spencer CE, Achillea N. A re-evaluation of the influence of maternal insulin-dependent diabetes on fetal nuchal translucency thickness and first-trimester maternal serum biochemical markers of aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 2010 Oct;30(10):937–40.
207. Dey S, Pavarino É, Gersak K, Marttala J, Teitelbaum AP, Ordonez E, et al. Down Syndrome. Kumar Dey S, editor. InTech; 2013.
208. Kagan KO, Staboulidou I, Cruz D, Wright D, Nicolaides KH. Two-stage first-trimester screening for trisomy 21 by ultrasound assessment and biochemical testing. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010 Apr 20;36(5):542–7.
209. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal Fraction in Maternal Plasma Cell-Free DNA at 11-13 Weeks' Gestation: Effect of Maternal and Fetal Factors. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(4):237–43.
210. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug;350(9076):485–7.
211. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 1998 Apr;62(4):768–75.

212. Norton, Norem, Nakagawa, Gregorich, Kuppermann. 713: Effect of changes in prenatal screening and diagnostic testing policies on resources utilization in a large, integrated health care system. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012 Jan 1;206(1):0–0.
213. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc; 2012 Apr 1;206(4):319.e1–319.e9.
214. Papageorgiou EA, Karagrorgiou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med*. 2011 Mar 31;17(4):510–3.
215. Evans MI, Wright DA, Pergament E, Cuckle HS, Nicolaides KH. Digital PCR for Noninvasive Detection of Aneuploidy: Power Analysis Equations for Feasibility. *Fetal Diagn Ther*. 2012;31(4):244–7.
216. Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc; 2012 Aug 1;207(2):137.e1–137.e8.
217. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc; 2012 Apr 1;206(4):322.e1–322.e5.
218. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc; 2012 Nov 1;207(5):374.e1–374.e6.
219. Chen EZ, Chiu RWK, Sun H, Akolekar R, Chan KCA, Leung TY, et al. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 18 and Trisomy 13 by Maternal Plasma DNA Sequencing. *Janecke AR*, editor. *PLoS ONE*. 2011 Jul 6;6(7):e21791.
220. Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011 Jan 11;342(jan11 1):c7401–1.
221. Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta*. 2001 May;22(5):399–404.
222. Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Künzel W, Clark KE. Uterine blood flow—a determinant of fetal growth. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S55–61.
223. Redman CWG, Sargent IL. Pre-eclampsia, the Placenta and the Maternal Systemic Inflammatory Response – A Review. *Placenta*. 2003 Apr;24:S21–7.
224. Carbillon L, Challier JC, Alouini S, Uzan M, Uzan S. Uteroplacental circulation development: Doppler assessment and clinical importance. *Placenta*. 2001 Nov;22(10):795–9.

225. Han VK. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the fetomaternal interface. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996 Jul 1;81(7):2680–93.
226. Lee PDP, Conover CAC, Powell DRD. Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993 Sep 30;204(1):4–29.
227. Wang HSH, Perry LAL, Kanisius JJ, Iles RKR, Holly JMJ, Chard TT. Purification and assay of insulin-like growth factor-binding protein-1: measurement of circulating levels throughout pregnancy. *J Endocrinol*. 1991 Jan 1;128(1):161–8.
228. Skomsvoll JFJ, Ostensen MM, Irgens LML, Baste VV. Perinatal outcome in pregnancies of women with connective tissue disease and inflammatory rheumatic disease in Norway. *Scand J Rheumatol*. 1999 Jan 1;28(6):352–6.
229. Fox H. Pathology of the placenta. *Clin Obstet Gynaecol*. 1986 Aug 31;13(3):501–19.
230. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002 Sep;20(3):219–25.
231. Spencer KK, Souter VV, Tul NN, Snijders RR, Nicolaides KHK. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999 Mar 31;13(4):231–7.
232. Clark F, Dickinson JE, Walters BN, Marshall LR, O’Leary PC. Elevated mid-trimester hCG and maternal lupus anticoagulant. *Prenat. Diagn*. 1995 Nov;15(11):1035–9.
233. Ferriman E, Sehmi I, Jones R, Railton A, Hilton R, Cuckle H. False positive maternal serum screening in systemic lupus erythematosus: a case report. *Prenat. Diagn*. 2000 Jan 1;20(10):851–6.
234. Heinig J, Steinhard J, Schmitz R, Nofer J-R, Kiesel L, Klockenbusch W. Influence of maternal systemic lupus erythematosus on first-trimester combined screening for chromosomal abnormalities. *Prenat. Diagn*. 2007 Jul 1;27(7):600–2.
235. Maymon R, Cuckle H, Sehmi IK, Herman A, Sherman D. Maternal serum human chorionic gonadotrophin levels in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Prenat. Diagn*. 2001 Feb;21(2):143–5.
236. La Montagna G, Baruffo A, Buono G, Tirri R. False positivity of prenatal Down’s syndrome and neural-tube tests in SLE. *Lancet*. 2000 Sep 29;356(9236):2–2.
237. Kierkuś J, Szymańska E, Szymańska S, Kamińska E. [Influence of inflammatory bowel disease on pregnancy and fertility - optimal treatment and management]. *Med Wieku Rozwoj*. 2013 Jan;17(1):77–84.
238. Vender RJ, Spiro HM. Inflammatory bowel disease and pregnancy. *J Clin Gastroenterol*. 1982 May 31;4(3):231–49.

239. Lateef A, Petri M. Management of pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Aug 20;:-.
240. Pedersen N, Bortoli A, Duricova D, D Inca R, Panelli MR, Gisbert JP, et al. The course of inflammatory bowel disease during pregnancy and postpartum: a prospective European ECCO-EpiCom Study of 209 pregnant women. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2013 Sep;38(5):501–12.
241. Dhar JP, Essenmacher LM, Ager JW, Sokol RJ. Pregnancy outcomes before and after a diagnosis of systemic lupus erythematosus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005 Sep 30;193(4):12–2.
242. Benn P, Borell A, Chiu R, Cuckle H, Dugoff L, Faas B. Position Statement from the Aneuploidy Screening Committee on Behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, April 2013. 2013;:1–17.
243. Cutolo M, Capellino S, Straub RH. Oestrogens in rheumatic diseases: friend or foe? *Rheumatology*. 2008 May 31;47(Supplement 3):iii2–iii5.
244. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Cutting edge assessment of the impact of autoimmunity on female reproductive success. *Journal of Autoimmunity*. 2012 May;38(2-3):74–80.
245. Gurtner GJG, Newberry RDR, Schloemann SRS, McDonald KGK, Stenson WFW. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003 Dec 1;125(6):12–2.
246. Zygumt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S10–8.
247. Boas Práticas Laboratoriais M. Manual de boas práticas laboratoriais. da Moeda INC, editor. *Diário da República - II série*. 2001 Apr 27;:7383–96.
248. Haddow JEJ, Palomaki GEG, Knight GJG, Williams JJ, Miller WAW, Johnson AA. Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N Engl J Med*. 1998 Apr 1;338(14):955–61.
249. Canick JAJ, Lambert-Messerlian GMG, Palomaki GEG, Neveux LML, Malone FDF, Ball RHR, et al. Comparison of serum markers in first-trimester down syndrome screening. *Obstetrics & Gynecology*. 2006 Nov 1;108(5):1192–9.
250. Akram DS, Astrup AV. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. 2004 Jun 21;:1–16.
251. Gibbons L, Belizán JM, Lauer JA, Betrán A, Meriáldi M, Althabe F. The Global Numbers and Costs of Additionally Needed and Unnecessary Caesarean Sections Performed per Year. World Health Organization, editor. *World Health report (2010)*. 2010 Nov 17;:1–32.
252. Osterman M, Martin J. Changes in Cesarean Delivery Rates by Gestational Age. National Center for Health Statistics, Center of Disease Control, editors. 2013 Jun 20;:1–8.
253. Crossley JA, Aitken DA, Cameron AD, McBride E, Connor JM. Combined ultrasound and biochemical screening for Down's syndrome in the first trimester: a Scottish multicentre study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2002 May 31;109(6):667–76.



## **ANEXOS**





The Fetal Medicine  
Foundation

117 Harley Street London W1G 6BG  
tel +44 (0) 20 7034 3070  
fax +44 (0) 20 7034 3071  
e-mail [fmf@fetalmedicine.com](mailto:fmf@fetalmedicine.com)  
web [www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)

Professor K Nicolaidis

15 November 2012

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

I, Professor Kypros H. Nicolaidis, Director of Harris Birthright Research Center of Fetal Medicine, King's College Hospital, accept being the Research Co-Supervisor of Maria José Rego de Sousa, MD, in the PhD thesis "Rastreo Combinado do 1º Trimestre e Doenças Autoimunes - Impacto das variáveis pré-analíticas" that is to be presented in Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

Yours sincerely,

Kypros Nicolaidis

## Anexo 1



- DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL · RASTREIO COMBINADO**     **1º TRIMESTRE**     **2º TRIMESTRE**  
11º-13ª semana + 6 dias    PAPP-A e β-hcg livre    14ª - 22ª semana    β-hcg livre + AFP
- RASTREIO PRÉ-ECLÂMPSIA · 1º TRIMESTRE**

**IDENTIFICAÇÃO DA GRÁVIDA**

NOME	DATA DE NASCIMENTO
EMAIL	TELEMÓVEL
MORADA	CÓDIGO POSTAL
Nº BENEFICIÁRIO	DATA DE COLHEITA
	DATA DA PRÓXIMA CONSULTA

**IDENTIFICAÇÃO DA ENTIDADE REQUISITANTE**

MÉDICO REQUISITANTE	E-MAIL
TEL.	MORADA
ASSINATURA MÉDICO REQUISITANTE	DATA

**INFORMAÇÃO CLÍNICA E HISTÓRIA FAMILIAR**

ETNIA CAUCASIANA     NEGRA     ASIÁTICA SUL     ASIÁTICA LESTE     MISTURA

PESO ACTUAL (KG)    PESO ANTES DE ENGRAVIDAR (KG)    ALTURA (M)    DATA PROVÁVEL DO PARTO (DPP)

HÁBITOS TABÁGICOS    S     N     SE SIM, Nº CIGARROS/DIA:

DIABETES INSULINO-DEPENDENTE  S  N    PARIDADE (Nº DE VEZES QUE ESTEVE GRÁVIDA)    ABORTOS ANTERIORES  S  N

FEZ RASTREIO PRÉ-NATAL EM GRAVIDEZES ANTERIORES  S  N    SE SIM, QUAL O RESULTADO  POSITIVO  NEGATIVO

FILHOS: NASCIDOS COM TRISSOMIA 21/13/18  S  N    COM DEFEITOS DO TUBO NEURAL  S  N    SE SIM, QUE TIPO DE DTN?

PATOLOGIAS AUTOIMUNES  S  N    SE SIM, QUAL?  SLE  SAF    OUTRA:

TOMA ALGUMA MEDICAÇÃO  S  N    SE SIM, QUAL?    MÉDICO ASSISTENTE

REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA (FIV, ICSI, GIFT)  S  N    SE SIM, QUAL?    MÉTODO:

TRANSF. EMBRIÕES    /    /    DATA EXTRACÇÃO    DATA NASCIMENTO DADORA    /    /    OU IDADE DADORA

**INFORMAÇÃO ECOGRÁFICA**

MÉDICO ECOGRAFISTA    FMF ID:

DATA DA ÚLTIMA MENSTRUACÃO (DUM)    /    /    DATA DA ECOGRAFIA    /    /

IDADE GESTACIONAL: PELA DATA DA ÚLTIMA MENSTRUACÃO (DUM)    PELA ECOGRAFIA

GRAVIDEZ  ÚNICA  MÚLTIPLA  BICORIÓNICA  BIAMNÓTICA

SEXO DO FETO  F  M    COMPRIMENTO CRÂNIO-CAUDAL [CRL] (mm)    TRANSLUCÊNCIA DA NUCA [NT] (mm)

OSSOS DO NARIZ (NB)  PRESENTES  AUSENTES  NÃO AVALIADOS

DIÂMETRO BIPARIETAL [DBP] (mm)    FREQUÊNCIA CARDÍACA FETAL

PULSATILIDADE ARTÉRIA UTERINA (UA-PI)    ARTÉRIA ESQUERDA    PI:    PICO VELOCIDADE SISTÓLICA [PSV] (cm/s)

PULSATILIDADE ARTÉRIA UTERINA (UA-PI)    ARTÉRIA DIREITA    PI:    PICO VELOCIDADE SISTÓLICA [PSV] (cm/s)

**HISTÓRIA OBSTÉTRICA - RASTREIO PRÉ-ECLÂMPSIA**

MULTÍPARA: SEM HISTÓRIA PRÉVIA PRÉ-ECLÂMPSIA     COM HISTÓRIA PRÉVIA PRÉ-ECLÂMPSIA     NULÍPARA (SEM GRAVIDEZ EVOLUTIVA >23S)

DIABETES MELLITUS TIPO I (INSULINO DEPENDENTE)  S  N     DIABETES MELLITUS TIPO 2 (NÃO INSULINO DEPENDENTE)  S  N

HIPERTENSÃO CRÓNICA  S  N     PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (DUAS MEDIÇÕES EM CADA BRAÇO) (MAP):

BRAÇO ESQUERDO: SISTÓLICA    |    |    |    BRAÇO DIREITO: SISTÓLICA    |    |    |    MÉDIA:

BRAÇO ESQUERDO: DIASTÓLICA    |    |    |    BRAÇO DIREITO: DIASTÓLICA    |    |    |    MÉDIA:

OUTRAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS:

**CONSENTIMENTO INFORMADO:** li e compreendi a informação sobre este rastreio. Desejo realizar os testes acima assinalados, de que fui devidamente e completamente informada, pelo que dou o meu consentimento para a colheita e conservação, sendo o seu uso exclusivo por profissionais médicos. Autorizo que o relatório seja enviado ao meu médico. Autorizo que os resultados obtidos nestes testes, possam ser utilizados em estudos científicos, desde que salvaguardados os dados individuais de identificação.

ASSINATURA GRÁVIDA



## Anexo 2

**INFORMAÇÕES SOBRE A EVOLUÇÃO E O RESULTADO DA GRAVIDEZ**

Exma. Sra. D<sup>ª</sup>.

DATA DO RASTREIO

N<sup>º</sup> REF<sup>º</sup> LAB

Agradecemos a sua colaboração no envio de alguns detalhes referentes à gravidez. Os seguintes itens são muito relevantes e, para nós, de grande ajuda no desenvolvimento do Diagnóstico Pré-Natal - Rastreio Combinado. Desde já agradecemos a sua colaboração. Por favor, devolva este inquérito no envelope RSF em anexo ou por fax.

**1. OUTROS EXAMES REALIZADOS NA GRAVIDEZ**

- RASTREIO BIQUÍMICO DO 2<sup>º</sup> TRIMESTRE  
 AMNIOCENTESE  
 BIÓPSIA DAS VILOSIDADES CORIÓNICAS  
 ANÁLISE DE SANGUE E LÍQUOR

**2. OCORREU ALGUMA COMPLICAÇÃO NA GRAVIDEZ ?**

NÃO  SIM

SE SIM, ESPECIFIQUE

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**3. DADOS DO PARTO**

DATA

LOCAL

TIPO DE PARTO: VAGINAL  CÉSARIANA

MÉDICO (A) PEDIATRA

MÉDICO (A) OBSTETRA

**4. RECÉM NASCIDO(S):**

NOME(S)

\_\_\_\_\_

PESO À NASCENÇA (KG)

ÍNDICE DE APGAR: 1 MIN \_\_\_\_\_ 5 MIN \_\_\_\_\_

O(s) bebé(s) necessitou de assistência na unidade de cuidados intensivos ou intermédios de Neonatologia? NÃO  SIM

SE SIM, ESPECIFIQUE

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Com quanto tempo de vida o(s) bebé(s) foi para casa?

DIAS \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_\_

Apresenta algum problema? NÃO  SIM

SE SIM, ESPECIFIQUE

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



## Anexo 3

**UK NEQAS** FOR PEPTIDE HORMONES AND RELATED SUBSTANCES

Telephone : +44 (0)131 242 6848  
FAX : +44 (0)131 242 6882  
Email : UKNEQAS@ed.ac.uk

Department of Clinical Biochemistry  
The Royal Infirmary of Edinburgh  
51, Little France Crescent  
Old Dalkeith Road  
Edinburgh EH16 4SA  
United Kingdom

Director : Dr. C M Sturgeon [+44 (0)131 242 6885]  
Deputy Director : Mr. A R Ellis

**CERTIFICATE OF PARTICIPATION, APRIL 2012 - MARCH 2013**

Labdiagnostica  
Av. Visconde Valmor No. 33-B  
1050 - 237 Lisboa  
Portugal

Lab 91077

I am pleased to be able to confirm that the above mentioned laboratory participates currently in the following schemes of the UK NEQAS for Peptide Hormones and Related Substances:

UK NEQAS for Maternal Serum Screening in the First Trimester (Down's)

*A. R. Ellis*

A. R. Ellis  
Scheme Manager

Tuesday, April 24, 2012

## Anexo 4

Telephone : +44 (0)131 242 6848  
FAX : +44 (0)131 242 6882  
Email : UKNEQAS@ed.ac.uk

Director : Dr. C M Sturgeon [*+44 (0)131 242 6885*]  
Deputy Director : Mr. A R Ellis

Department of Clinical Biochemistry  
The Royal Infirmary of Edinburgh  
51, Little France Crescent  
Old Dalkeith Road  
Edinburgh EH16 4SA  
United Kingdom

**CERTIFICATE OF PARTICIPATION, APRIL 2013 - MARCH 2014**

Labdiagnostica  
Av. Visconde Valmor No. 33-B  
1050 - 237 Lisboa  
4150-174  
Portugal

Lab 91077

I am pleased to be able to confirm that the above mentioned laboratory participates currently in the following schemes of the UK NEQAS for Peptide Hormones and Related Substances:

UK NEQAS for Maternal Serum Screening in the First Trimester (Down's)

*A. R. Ellis*

A. R. Ellis  
Scheme Manager

Tuesday, July 16, 2013

## Anexo 5

24 December 2013



The Fetal Medicine  
Foundation

137 Harley Street, London, W1G 0BG  
TEL: +44 (0) 20 7034 3070  
FAX: +44 (0) 20 7034 3071  
E-MAIL: [fmf@fetalmedicine.com](mailto:fmf@fetalmedicine.com)  
WWW: [www.fetalmedicine.com](http://www.fetalmedicine.com)

Professor K Nicolaides

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

I, Professor Kypros Nicolaides, Director of Harris Birthright Research Center of Fetal Medicine, King's College Hospital, authorize the use of a database of 48,303 pregnant women screened in the first trimester for Down Syndrome, collected in the referred Center and given by me to Maria José Rego de Sousa, MD for the purpose of pursuing with the PhD project "Rastreo Combinado do 1º Trimestre e Doenças Autoimunes - Impacto das variáveis pré-analíticas" that is being presented in Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

Yours sincerely

Kypros Nicolaides

