

Simão L¹; Serafim S¹; Silva M¹; Alves C¹; Brito F¹; Ambrósio P¹; Geraldês M C¹; Bárbara M¹; Ferreira C¹; Pedro S¹; Tarelho A R¹; Furtado J¹; Cohen A²; Ferreira A³; Mourinha V³; Correia H¹

¹ Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa. ² Centro de Diagnóstico Pré-Natal, Maternidade Dr. Alfredo da Costa; Centro Hospitalar Lisboa Central, EPE, Lisboa. ³ Centro e Diagnóstico e Terapêutica Pré-Natal, Hospital de Faro, Centro Hospitalar Universitário do Algarve, EPE, Faro.

INTRODUÇÃO

As anomalias do crescimento fetal são uma importante causa de morbilidade e mortalidade perinatais¹. Têm implicações na saúde infantil e, inclusivamente, impacto na saúde na idade adulta^{1,2,3}. A restrição de crescimento fetal (RCF) refere-se a todo o feto que não atinge o potencial de crescimento para a sua idade gestacional^{1,4}. É em geral descrita para um peso estimado abaixo do percentil 10^{5,6}. A incidência varia de acordo com a população em estudo, as curvas de crescimento e as fórmulas utilizadas como referência e com o percentil escolhido para determinar o crescimento anómalo (P3, P5, P10)^{1,4}. De qualquer modo, admite-se que, aproximadamente 5 a 10% das gestações apresentam um feto com RCF^{3,6,7}. Cerca de dois terços correspondem a fetos adequadamente nutridos mas constitucionalmente pequenos ou leves para a idade gestacional (por vezes denominados LIG)^{1,4,6}. Os fatores envolvidos na RCF podem ser maternos, placentários e fetais. Nos fatores fetais, as cromossomopatias estão descritas entre 6,4% e 40% dos fetos com RCF^{8,9}.

OBJETIVOS

Pretende-se, de entre os fatores fetais relacionados com a RCF, conhecer e avaliar o tipo e significado das cromossomopatias, o seu valor diagnóstico no DPN e suas implicações no período perinatal. Além disso pretende-se avaliar o impacto da introdução da metodologia de *microarray* no DPN de RCF por comparação com o cariotipo.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

No período considerado recebemos 56 amostras com indicação de RCF, com idade gestacional entre as 11 e as 34 semanas. A idade gestacional média foi de 25 semanas. Foram identificadas 6 alterações cromossómicas em 31 casos com estudo citogenético/pesquisa de microdeleções. Nos casos com *microarray* foram detetadas 4 alterações em 25 casos (Tabela 1). Nos 10 (17,9%) fetos portadores de cromossomopatia, seis apresentavam RCF isolado, ou associado a alterações do líquido amniótico, e quatro apresentavam RCF associada a outras malformações fetais, designadamente do foro cardíaco. As cromossomopatias identificadas nestes fetos incluíram trissomias 18, triploidias e ganhos/perdas de material genómico nos casos estudados por *microarray*. A idade de gestação média nos casos com cromossomopatias foi de 24,1 semanas, enquanto nos casos sem anomalias cromossómicas foi de 25,2 semanas.

Fez-se uma comparação sucinta com um estudo similar realizado no laboratório entre 1987 e 2006, em que todas as anomalias foram identificadas por cariotipo. Há um aumento na deteção relativa de anomalias estruturais (de 5,9 para 8,9%), na maioria submicroscópicas, devido à introdução do *microarray*. As triploidias e trissomias foram detetadas com uma média de idade gestacional inferior no presente estudo. A taxa de deteção de trisomia 18 foi inferior, provavelmente pela deteção precoce em rastreios bioquímicos/combinados e de anomalias ecográficas, que não chegam a ter como indicação clínica a RCF. Houve uma descida na idade de gestação de deteção de RCF, devida provavelmente aos critérios de avaliação e protocolos usados, mas também a um procedimento ecográfico mais precoce, sensível e abrangente.

Um dos casos identificados por *microarray* consistiu numa deleção de 13,10 Mb em 6q12q14.1 com indicação clínica de RCF e agenésia renal, que fez posteriormente IMA (Figura 1). Deleções intersticiais proximais em 6q são relativamente raras. No entanto há alguns casos descritos de deleções incluídas na região 6q12q14.1 em fetos com RCF, mas também com múltiplas anomalias estruturais. Esta variabilidade fenotípica dificulta o estabelecimento de uma relação direta genotipo–fenotipo.

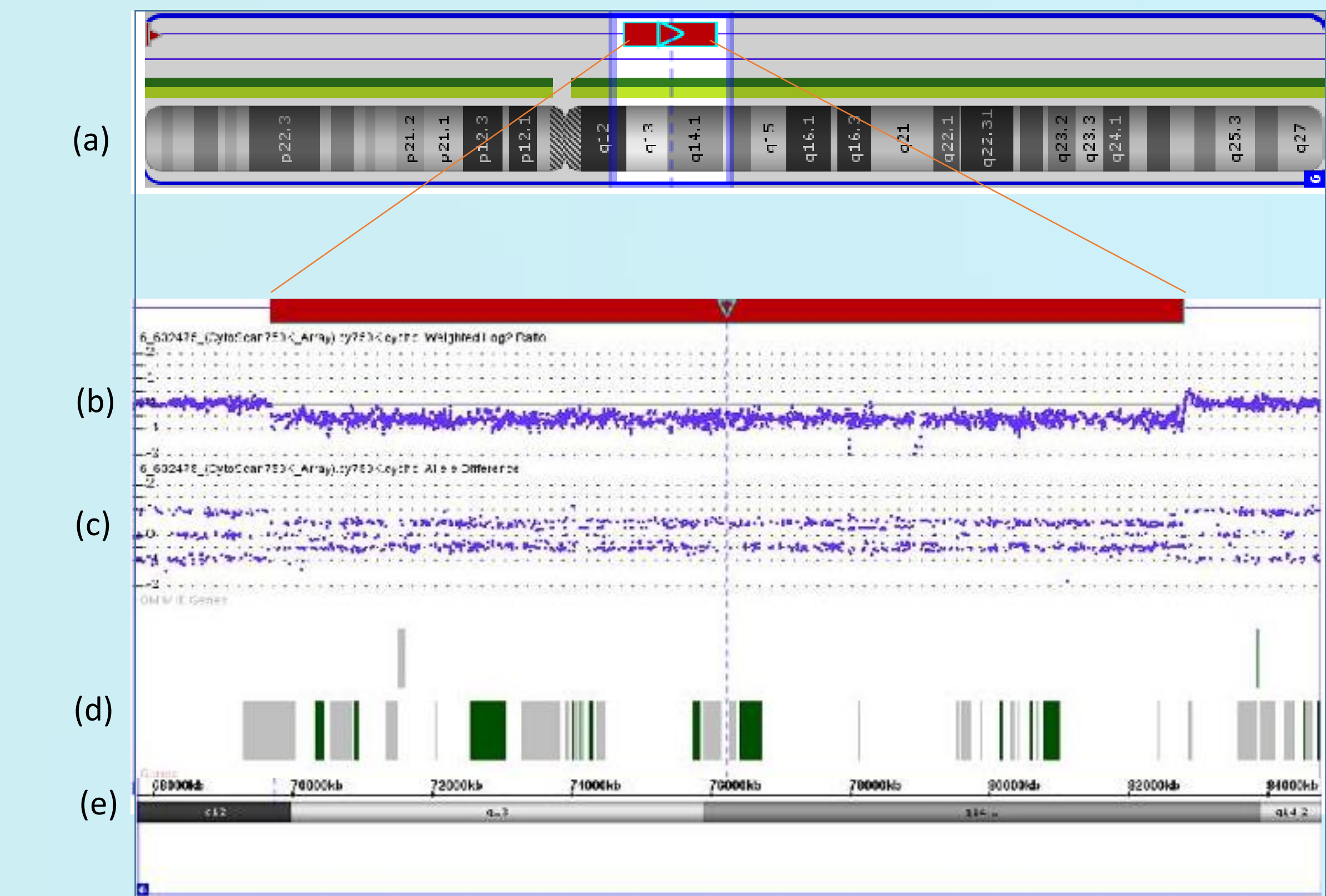


Figura 1. Caso 7 - Perfil de array para o cromossoma 6: (a) ideograma do cromossoma 6 onde se evidencia a perda na região 6q12q14.1; (b) intensidade do sinal para as sondas de oligonucleótidos para a região 6q12q14.1; (c) distribuição das sondas SNPs ao longo da região 6q12q14.1; (d) genes OMIM presentes na região, com os genes mórbidos identificados a verde; (e) ideograma parcial da região delecionada.

➤ O incremento na deteção de cromossomopatias nos casos de RCF em que se fazem estudos por *microarray* é atualmente bem reconhecido, devido ao limite de resolução do cariotipo^{10,11}. O valor clínico do CMA na RCF tem sido estudado: incremento da taxa de deteção entre 5,5% e 16% na globalidade das RCF; incremento entre 4% e 17% nas RCF isoladas e incremento entre 6,1% e 20% nas RCF associadas a outras anomalias fetais^{11,12,13,14}. No presente estudo, os casos avaliados por cariotipo e por *microarray* não foram os mesmos, devido ao prévio estudo de DRA. Extrapolando que 3 das alterações encontradas nos casos com *microarray* não seriam detetadas no cariotipo haveria um incremento de 12% na taxa de deteção. Se tivermos em conta que apenas um deles tem um significado patogénico reconhecido à data, esse valor é de 4%. Existe um valor adicional do CMA mesmo nos casos com significado clínico incerto. Ganha-se conhecimento genético e dependendo da alteração ser herdada ou *de novo*, da história familiar e do tipo de transmissão, o significado clínico pode ser revisto, podendo entre outras possibilidades, caminhar-se para estudos de inativação ou sequenciação de determinados genes.

→ **Importância realização de *microarray*.**

➤ A RCIU, embora de etiologia multifactorial e variabilidade clínica muito ampla, está também associada a alterações em genes, quer no feto quer na mãe. A metilação em genes que se expressam na função placentar tem um papel importante na RCF¹⁵. A relação entre genes e RCF está em constante investigação.

→ **Importância conservação material fetal e placentar para estudos futuros.**

➤ Existe no presente estudo uma presença simultânea de RCF e cardiopatias em alguns dos casos. Sabemos que a circulação normal de sangue rico em oxigénio é necessária para o crescimento fetal e perinatal normais e que os fetos com anomalias cardíacas apresentam frequentemente RCF³. Vários estudos demonstraram que a RCF em fetos com disfunções cardíacas podem persistir e condicionar a vida na idade adulta e salientam a importância de um “follow-up” cardiovascular a longo termo em pacientes que apresentaram RCF *in utero*¹⁶. A RCF é uma entidade muito complexa que tem implicações na saúde da criança e do adulto.

→ **Importância “follow-up” e dum acompanhamento multi-sistémico a longo termo.**

Assim, globalmente, a frequência de cromossomopatias encontrada neste estudo (cerca de 18%) revela a importância do diagnóstico genético em fetos com RCF, mesmo em RCF isolado. O valor do CMA nos casos de RCF é evidenciado. Por outro lado, as implicações na vida pós-natal incluindo a infância e a vida adulta devem levar a um acompanhamento a longo termo na presença de RCF.

REFERÊNCIAS

1. Gordijn I, et al. (2016) Ultrasound Obstet Gynecol. 48:333-339.

2. Stanford Childrens’s Health (2019) “Fetal Growth Restriction”.

3. Rodrigues MC, (2012) Revista de Pediatria do Centro Hospitalar do Porto. Vol XXI, 3.

4. Sociedade Portuguesa de Neonatologia (2018). Restrição de crescimento fetal.

5. Figueras F, et al. (2014) Fetal Diagn Ther. 36(2): 86-98.

6. Medicina Materno-Fetal. 2005. Mendes da Graça L, 3ª ed.

7. Bamfo J, et al. (2011). Journal of Pregnancy. 2011:1-15.

8. Sagi-Dain L, (2017) Prenat Diagn. Doi: 10.1002/pd.5160 .

9. Snijders RJ, et al. (1993) Am J Obstet Gynecol.168(2):547-55.

10. Schaffer L, et al. (2012) Prenat Diagn. 32:986-995.

11. Brun S, et al. (2018) Prenat Diagn. 38(13):1111-1119.

12. An G, et al. (2018) Molecular Cytogenetics: 11:33.

13. Borrell A, et al. (2017) Fetal Diagn Ther. 42(3):174-180.

14. Pérez S, et al. (2018) Clin Obstet Gynecol Reprod Med. 4(3):1-5.

15. Xiao X, et al. (2016) Epigenomics 8(1):33-42

16. Demicheva E, et al. (2014) Fetal Diagn Ther. 36(2):143-53.

METODOLOGIA

Procedeu-se ao estudo retrospectivo das amostras recebidas entre novembro de 2013 e novembro de 2018, com indicação clínica de RCF isolado ou associado a alterações ecográficas. O procedimento seguiu os protocolos de conduta instalados no laboratório e/ou os pedidos de atuação que acompanhavam as amostras. Em parte das amostras era pedido o estudo citogenético e o Diagnóstico Rápido de Aneuploidias (DRA), mas nas amostras mais recentes era pedido DRA e estudo por *microarray*. Em geral, o DRA foi usado como teste inicial seguido por estudos de citogenética clássica ou por *microarray*, isto é, a existência de DRA normal conduziu à realização de *microarray*.

Tabela 1: Casos de RCF com anomalia no cariotipo ou no <i>microarray</i> (I.M. - idade materna; S.G. - Semana + dias de gestação).					
Caso	I.M.	S.G.	Indicação	DRA	Cariotipo / <i>microarray</i>
1	30	22+1	RCF precoce e grave.	Triploidia XXX	69,XXX
2	34	11+4	RCF.	Triploidia XXY	69,XXY
3	28	19+1	RCF (Feto morto). Diminuição LA.	-	69,XXX
4	30	13+2	Suspeita T18 (RCIU).	+18, XY	47,XY,+18
5	41	29	RCF. Hérnia diafragmática esquerda com estômago intra-tóraco. Coração esquerdo hipoplásico. Rim esquerdo não visualizado.	+18, XX	47,XX,+18
6	25	29	RCF grave e cardiopatia. Pede Catch 22. Pesquisa de deleções por MLPA	-	46,XY,rsa 22q11.2 (HIC2-TOP3B)x1 Deleção em 22q11.2
7	39	23+3	RCF e agenésia renal.	XX	Deleção intersticial com 13,10 Mb em 6q12q14.1. Significado clínico patogénico.
8	35	32+2	RCF e suspeita de cardiopatia.	XY	Deleção intersticial com 78 Kb em Xp21.1. Significado clínico incerto, embora provavelmente patogénico num indivíduo do sexo masculino.
9	42	30+4	RCF.	XY	Deleção intersticial com 116 Kb em 5q12.1. Significado clínico incerto.
10	22	30+5	RCF precoce e grave. Pesquisa Toxoplasmose e CMV.	XX	Ganho com cerca de 121 Kb em Xq21.1. Num indivíduo sexo feminino provavelmente benigno.

Podemos retirar algumas conclusões:

➤ O DRA utilizado como teste inicial permite dirigir as amostras para os diferentes estudos subsequentes, designadamente estudo citogenético ou *microarray*, o que permite rentabilizar meios e metodologias. A RCF apresentou uma taxa de 9% de aneuploidias e euploidias o que revela a importância da sua identificação precoce.

→ **Importância da realização de DRA.**

➤ A partir do cariotipo seriam identificados provavelmente 7 anomalias (12,5% dos RCF). Nas aneuploidias, o cariotipo permite identificar rearranjos estruturais dos cromossomas envolvidos e algum grau de mosaicismo. O cariotipo permite eficazmente a identificação das triploidias. A triploidia é comum nos casos de RCF e constitui cerca de 27% das anomalias encontradas nesta coorte podendo, assim, a RCF ser considerada como bom marcador desta situação.

→ **Importância realização cariotipo.**