

# Implementação da citogenética molecular para o diagnóstico rápido da trissomia 21 e a incidência da Síndrome de Down no município de Campos dos Goytacazes, Brasil, no período 2006-2008

Implementation of molecular cytogenetics for the rapid diagnosis of trisomy 21 and the incidence of Down Syndrome in the municipality of Campos dos Goytacazes, Brazil, in the period 2006-2008

<sup>1</sup> Antônio Francisco Alves da Silva, <sup>2</sup> Filipe Brum Machado, <sup>3</sup> Regina Célia de Souza Campos Fernandes, <sup>4</sup> Enrique Medina-Acosta.

<sup>1</sup> Biólogo, Hospital Escola Álvaro Alvim.

<sup>2</sup> Biólogo, Mestre em Biociências e Biotecnologia, Hospital Escola Álvaro Alvim.

<sup>3</sup> Médica Pediatra, Mestre e Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Professora da Disciplina de Pediatria da Faculdade de Medicina de Campos, Campos dos Goytacazes, RJ.

<sup>4</sup> Mestre e Doutor em Parasitologia Médica e Molecular, Professor Associado do Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF, Chefe do Laboratório de Biotecnologia, Coordenador do NUDIM.

## Resumo

**Introdução:** A Síndrome de Down é a forma genética mais comumente identificada de retardo mental e uma das principais causas de defeitos específicos e de condições médicas associadas no nascimento. Três mecanismos genéticos causam a Síndrome de Down: trissomia 21 livre (92-95%), mosaicismo (2-4%) e translocação (3-4%). A suspeita clínica pode ser confirmada por exame de cariotipagem por banda G, teste de citogenética clássica considerado padrão-ouro. Além da demora na obtenção do resultado (1-6 meses), a cariotipagem em crianças requer a coleta > 5 mL de sangue periférico, o que é indesejável em casos de emergência neonatal. A Região Norte do Estado do Rio de Janeiro carece de serviços que executem esse exame, que é remetido para laboratórios localizados nas cidades do Rio de Janeiro, Belo Horizonte e São Paulo.

**Objetivos:** Implementar no município de Campos dos Goytacazes um serviço especializado que disponibilize um teste genético rápido para trissomia 21.

**Pacientes/Métodos:** Nascidos no município de Campos dos Goytacazes, no período de janeiro de 2006 a novembro de 2008, referidos por suspeita clínica de Síndrome de Down por médicos ao Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular - NUDIM, sede Hospital Escola Álvaro Alvim. O teste genético consistiu da tipagem e dosagem alélicas de cinco a oito marcadores polimórficos de DNA específicos para o braço longo do cromossomo 21 (região 21q) pelo método da reação multiplex quantitativa fluorescente em cadeia da polimerase.

**Endereço para correspondência:** Enrique Medina-Acosta, NUDIM - Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, sede Hospital Escola Álvaro Alvim, Rua Barão da Lagoa Dourada 409, Prédio novo, 1º andar, Pelinca, Campos dos Goytacazes CEP 28035-010, Tel/Fax: (022) 2726 6758; E-mail: quique@uenf.br

## Abstract

**Introduction:** Down syndrome is the most commonly identified genetic form of mental retardation and one of the main causes of specific birth defects and medical conditions associated at birth. Three genetic mechanisms cause Down syndrome: free trisomy 21 (92-95%), mosaicism (2-4%) and translocation (3-4%). The clinical suspicion may be confirmed by the band G karyotype exam, the classic cytogenetic test that is considered gold standard. In addition to the delay in obtaining the results (1-6 months), karyotyping in children requires the sample collection of >5 mL of peripheral blood, which is undesirable in cases of neonatal emergency. The Northern Region of the State of Rio de Janeiro lacks services that execute this exam, which, in turns, is remitted to laboratories localized in the cities of Rio de Janeiro, Belo Horizonte and São Paulo.

**Objectives:** To implement in the municipality of Campos dos Goytacazes a specialized service that disposes a rapid genetic test for trisomy 21.

**Patients/Methods:** Children born in the municipality of Campos dos Goytacazes within the period of January 2006 to November 2008, referred for clinical suspicion of Down syndrome by clinicians to the Molecular Identification and Diagnostics Unit - NUDIM, headquartered in the School Hospital Álvaro Alvim. The genetic test consists of typing and dosing alleles for five to eight DNA polymorphic markers specific for the long arm of the chromosome 21 (21q region) by the method of multiplexed quantitative fluorescence polymerase chain reaction.

**Resultados:** Foram referidos 41 pacientes com suspeita de Síndrome de Down. Trinta e quatro dos casos (82,9%) tiveram confirmação diagnóstica pelo teste de DNA. A maioria (54%) dos acometidos nasceu de mulheres com idades > 35 anos, confirmado que a idade reprodutiva materna avançada é fator de risco para não disjunção cromossômica. Considerando a taxa anual média de 7874 nascidos vivos, a incidência de um acometido pela trissomia 21 em 695 crianças foi estimada para o município.

**Conclusões:** O teste de DNA para trissomia 21 permitiu confirmar ou afastar a suspeita clínica, com resultados obtidos em até 48 horas da coleta da amostra biológica (média de 7 dias para a entrega de resultados), podendo ser utilizado como teste diagnóstico preciso e rápido e, portanto, de fácil inserção pelos serviços de monitoramento, diagnóstico e atendimento de referência.

**Descriptores:** trissomia 21, Síndrome de Down, aneuploidia, citogenética molecular, marcador genético.

**Results:** There were 41 patients referred with clinical suspicion of Down syndrome. Thirty four of the cases (82,9%) had diagnosis confirmed by the DNA test. The majority (54%) of the affected children born to women > 35 year of age, confirming that advance reproductive maternal age is a factor for non disjunction of trisomy 21. Considering the annual mean rate of 7874 life births, an incidence of one affected by trisomy 21 in 695 infants was estimated for the municipality.

**Conclusions:** The DNA test for trisomy 21 allowed confirming or ruling out the clinical suspicion, with results obtained in up to 48 hours from biological sample collection (mean of 7 days for turning in the results), enabling its use as a precise, rapid diagnostic test and, therefore, of easy insertion by monitoring, diagnostic and referring services.

**Keywords:** trisomy 21, Down syndrome, aneuploidy, molecular cytogenetic assay, genetic marker.

## Introdução

Em humanos, a trissomia 21 (Síndrome de Down, OMIM #190685) é uma das principais causas de dificuldade severa de aprendizagem, a forma genética mais comumente identificada de retardo mental, e frequentemente associada com outros defeitos congênitos incapacitantes. Esta aneuploidia autossômica acomete um em cada 350 a 400 nascidos vivos de mulheres com idade reprodutiva > 35 anos<sup>1</sup>. Provavelmente >70% das concepções reconhecidas com esta anomalia são espontaneamente perdidas durante a gravidez<sup>2,3,4,5</sup>. Assim sendo, a incidência de trissomia 21 é ainda maior, pois os acometidos representam uma proporção relativamente pequena de todas as gestações afetadas.

A confirmação diagnóstica da suspeita clínica de trissomia 21 pode ser feita pelo exame de cariotipagem por banda G, o teste laboratorial diagnóstico padrão ouro, que consiste na visualização citogenética da cópia extra do cromossomo 21<sup>6</sup>. Em países desenvolvidos, o diagnóstico pré-natal ou pós-natal da suspeita clínica é virtualmente sempre confirmado pelo teste citogenético<sup>4</sup>. Nos países em desenvolvimento, porém, a grande maioria dos casos é diagnosticada tardia e clinicamente no parto ou no período perinatal, por causas diversas relacionadas ao acesso aos exames específicos.

Na última década foram introduzidas técnicas de Biologia Molecular que auxiliam no diagnóstico definitivo. Por exemplo, a tipagem de marcadores polimórficos de DNA localizados no braço longo do cromossomo 21 utilizando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite confirmação diagnóstica precisa e rápida da trissomia 21<sup>7</sup>. Em vários países desenvolvidos a confirmação diagnóstica pela tipagem de DNA já é também oferecida no pré-natal<sup>8,9</sup>. Diferentemente da citogenética clássica, a tipagem de DNA com marcadores altamente polimórficos (isto é, informativos) em núcleos familiares (mãe, pai e acometido) permite determinar com precisão a origem parental da não disjunção cromossômica, e evidenciar eventos de recombração<sup>10,11</sup>.

## Aspectos moleculares da trissomia do cromossomo 21

Estudos revelam três mecanismos genéticos que cau-

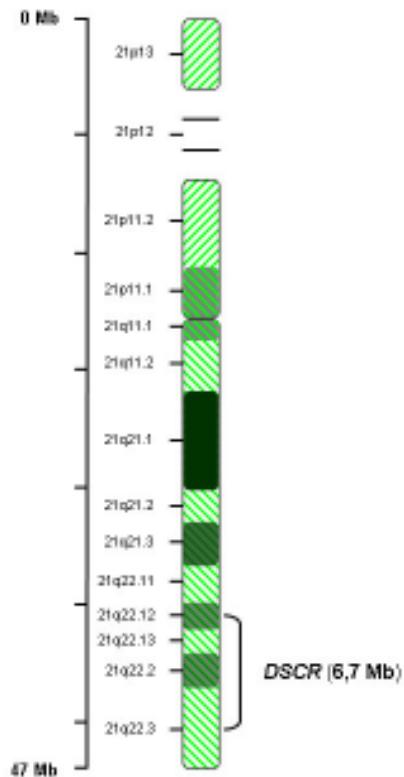
sam a Síndrome de Down: a trissomia 21 livre (92-95%), mosaicismo (2-4%) e translocação (3-4%)<sup>12,13,14</sup>.

A trissomia 21 livre, também conhecida como trissomia 21 completa, é caracterizada pela ocorrência de uma cópia extra do cromossomo 21 (46.944.323 pares de bases; sequência referência NCBI NC\_000021), comumente atribuída à não disjunção cromossômica primária de dois cromossomos 21 durante a primeira divisão meiótica (80-85%), mas freqüentemente de origem embrionária materna (90%)<sup>15</sup>. Porém, recentemente foi sugerido que a causa embrionária de origem materna mais provável é o mosaicismo ovariano para trissomia 21, que é observado em fetos femininos fenotipicamente (aparentemente) normais contendo entre 0,2-0,8% de células trissômicas<sup>16</sup>. Atenta-se ao fato que o mosaicismo é um estado de aneuploidia pós-zigótica, isto é, de origem mitótica e não meiótica, que também tem sido descrito em tecido ovariano adulto em mães de acometidos com a Síndrome de Down<sup>17</sup>. Assim sendo, o problema decisivo residiria na segregação de três cromossomos 21 pré-existentes em células ovarianas, por meio de não disjunção secundária obrigatória durante a primeira divisão meiótica do ovócito trissômico. A trissomia 21 ovariana fetal (também referida como aneuploidia por mosaicismo parental gonadal) ocorre na mesma freqüência em células em pré-meiose e meiose, assim com em células do estroma do mesênquima do ovário, o que demonstra que o erro primário na meiose não é a principal causa da não disjunção cromossômica<sup>16</sup>.

Diversos estudos baseados no mapeamento do cromossomo 21 apontam a superexpressão de genes contidos entre as regiões 21q21.12 e 21q22.3, denominada Região Crítica para a Síndrome de Down (*Down Syndrome Critical Region, DSCR*) como fator determinante das características típicas apresentadas na síndrome<sup>18</sup>. A região *DSCR* compreende 86 genes. Ela estende aproximadamente 6,7 megabases desde o limite proximal entre os marcadores *D21S17* (região 21q22.12; posição física 35.892.325-35.892.536 pb da região p-tel) e *D21S55* (região 21q22.13; posição física 38.012.252-38.012.412 pb) até um limite distal na região

21q22.3 entre os genes *MX1* (homólogo do gene em camundongos para resistência a *Myxovirus*; posição física

41.720.024-41.753.008 pb) e *TFF1* (*trefoil factor 1*, 42.655.460-42.659.713 pb)<sup>19</sup>. Figura 1.



**Figura 1**

Ideogramma do cromossomo 21 humano, identificando as regiões citogenéticas, o padrão de bandas e a posição física da Região Crítica para a Síndrome de Down (*Down Syndrome Critical Region*, *DSCR*).

A região *DSCR* tem sido associada com várias das características fenotípicas da síndrome, incluindo a dismorfologia do esqueleto craniofacial<sup>20</sup>. Embora o fenótipo seja mais provavelmente relacionado ao aumento na dosagem gênica de uma minoria dos 386 genes localizados no cromossomo 21, a genética molecular da síndrome permanece especulativa. Contudo, um estudo recente em camundongos transgênicos para a região *DSCR* de humanos demonstrou que essa região inesperadamente não causa fenótipos específicos de dismorfismo craniofacial no modelo animal da Síndrome de Down<sup>21</sup>. Um estudo anterior sugeriu que a instabilidade genômica gerada pela cópia extra do cromossomo 21 seria a causa do fenótipo apresentado pelos acometidos pela Síndrome de Down<sup>22</sup>.

#### Aspectos Clínicos da Síndrome de Down

A apresentação clínica do acometido pela trissomia 21 é complexa; algumas características ocorrem em graus diferenciados de um indivíduo para outro, incluindo o retardamento mental e o dismorfismo facial característico. Em geral, entre os achados clínicos reconhecíveis estão: braquicefalia, face achatada, olhos com fendas palpebrais oblíquas e voltadas para cima, lobo auricular anormal, com implantação baixa das orelhas, pescoço curto, boca significativamente

pequena, língua protusa, e mãos com dedos relativamente curtos, hipotonía muscular e baixa estatura (OMIM #190685).

A trissomia 21 é também um fator de risco para inúmeras doenças; ela está entre as principais causas de doenças congênitas do coração, com uma ocorrência de 40 a 50%<sup>23</sup>. A manutenção de ambos os cromossomos maternos ou paternos no acometido (isto é, a condição denominada de heterotriassomia) é considerada fator contribuinte para o defeito ventricular septal associado à Síndrome de Down<sup>24</sup>. A condição heterotriassómica do gene *DSCAM* (*Down syndrome cell adhesion molecule*; posição no cromossomo: 21q22.2; posição física: 40.306.213-41.140.909 pb) é considerada suficiente para a produção de alguns tipos de doença congênita do coração. Esse gene candidato para a doença congênita do coração em acometidos está localizado na região denominada *DS-CHD* (*Down Syndrome Congenital Heart Disease region*), delimitada pelo marcador não polimórfico *D21S3* (definido pelo defeito ventricular septal; posição física: 39.303.740 pb) e o gene *PFKL* (*liver phosphofructokinase*, definido pela tetralogia de Fallot; posição no cromossomo: 21q22.3; posição física: 44.544.358-44.571.689 pb)<sup>25</sup>.

A histopatologia da doença de Alzheimer também é muito frequente em acometidos pela Síndrome de Down, com os sintomas

sendo apresentados nos indivíduos trissômicos a partir dos 40 anos de idade<sup>26</sup>. Padrões alterados de recombinação meiótica no cromossomo 21, muito provavelmente na região 21q11.2 (marcador D21S16; posição física 14.752.283 bp) associada à precocidade da doença familiar de Alzheimer, têm sido sugeridos ser base molecular da associação da doença de Alzheimer com a Síndrome de Down<sup>27</sup>. Baseado nesse racional, diferentes padrões de recombinação meiótica no cromossomo 21 não-disjunto são previstos entre acometidos pela Síndrome de Down, agrupados conforme a doença de Alzheimer concomitante.

Os acometidos pela Síndrome de Down também apresentam em geral uma alta propensão para alguns tipos de leucemia e de reação leucemóide, de 10 a 20% maior quando comparado a indivíduos não trissômicos<sup>28,29</sup>. Por muito tempo esta propensão para defeitos congênitos em portadores da Síndrome de Down foi responsável por uma letalidade considerável. Nas últimas três décadas com os avanços na medicina, e com diagnósticos cada vez mais rápidos, a expectativa de vida entre os acometidos pela trissomia 21 está em torno de 49 anos de idade<sup>30</sup>.

#### Fatores de risco para a não disjunção do cromossomo 21

Dois fatores de risco para a não disjunção cromossômica são reconhecidos: Idade reprodutiva materna >35 anos e recombinação reduzida ou alterada ao longo do cromossomo 21, que é independente da idade parental<sup>31</sup>.

A alta freqüência de não disjunção cromossônica de origem materna é devido à idade avançada das gestantes, a tal ponto de constituir o único fator de risco bem estabelecido. O efeito da idade materna é provavelmente causado pela seleção diferenciada das células ovarianas maternas trissômicas durante o desenvolvimento fetal e pós-natal até a ovulação<sup>16</sup>. A ocorrência excepcional de um alto grau de mosaicismo ovariano pode explicar o porquê algumas mulheres jovens têm filhos acometidos pela Síndrome de Down e a associação com maior incidência de recorrência. Na Inglaterra, a freqüência de acometidos pela trissomia 21 nascidos de mulheres < 25 anos de idade é de aproximadamente 2%; aos 36 anos de idade sobe para 10%, alcançando 33% aos 42 anos de idade<sup>1,4</sup>. Os dados do *Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações* (ECLAMC) são similares: 40% dos acometidos nascem de mulheres com idades entre 40 e 44 anos, embora mulheres nesta faixa etária sejam responsáveis por apenas 2% do total de nascimentos<sup>32</sup>. Assim sendo, devido às diferenças em taxas de natalidade e idades reprodutivas observadas entre os países desenvolvidos e em vias desenvolvimento, a distribuição de acometidos por faixa etária materna varia.

No Brasil, há poucos estudos sobre a Síndrome de Down e a associação com fatores de risco reconhecidos<sup>33</sup>. Um estudo baseado em uma população do estado da Bahia mostrou que, apesar das características regionais da região Nordeste<sup>34</sup>, a distribuição de fatores tanto dependentes quanto independentes da idade materna é a mesma da distribuição no Sudeste.

Visando contribuir para reversão desse quadro de necessidade diagnóstica, em 2006 implantamos no Hospital Escola

Álvaro Alvim o serviço de Biologia Molecular para confirmação diagnóstica de trissomia 21, disponibilizando o teste de DNA que requer a coleta de esfregação bucal e cujo resultado pode ser emitido em até 48 horas. O presente trabalho trata da nossa experiência, pioneira no Brasil, sobre a implementação do teste molecular para trissomia 21 no período 2006-2008 no município de Campos dos Goytacazes e as implicações para epidemiologia nacional desta anomalia genética.

#### Pacientes e métodos

Os objetivos do presente estudo constituem parte de um projeto sobre cromossomopatias aprovado pela Comissão Regional de Ética, Faculdade de Medicina de Campos e pelas instituições participantes. Foram incluídos no estudo os pacientes pediátricos referidos ao Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular – NUDIM, sede Hospital Escola Álvaro Alvim, por médicos do município de Campos dos Goytacazes, com suspeita clínica de Síndrome de Down, nascidos no município no período de janeiro de 2006 a novembro de 2008. O atendimento oriundo de outros municípios da região não foi computado para este estudo. A inclusão no estudo foi voluntária e o atendimento gratuito. Todos os responsáveis legais deram consentimento livre e esclarecido por meio de assinatura de termo próprio. Todos os pacientes também foram examinados por uma única pediatra da equipe (R.C.S.C.F.).

**Material biológico e extração de DNA:** Sangue periférico (< 1 mL) ou um swab bucal foi coletado de cada paciente. DNA genômico foi extraído utilizando o kit comercial Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare, UK) e subsequentemente armazenado em freezer a -20 °C.

**Tipagem de DNA:** Tipagem e dosagem alélicas de cinco a oito marcadores microsatélites polimórficos específicos localizados em 21q11.2, 21q21.1, 21q21.3, 21q22.3, 21q21.3, 21q22.11, 21q22.11, 21q22.12, específicos para o braço longo (*q*) do cromossomo 21 (região 21*q*, que inclui a região *DSCR*) utilizando a reação multiplex quantitativa fluorescente em cadeia da polimerase (QF-PCR). A reação de amplificação (12,5 mL) consistiu de aproximadamente 4 ng de DNA genômico, 0,25-1 mM dos iniciadores, 0,2 mM dNTP, 1,25 U *Taq* Gold polimerase (Applied Biosystems, USA), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 e 50 mM KCl. As condições de amplificação foram 95 °C por 11 min (1 ciclo); 94 °C x 1 min; 59 °C x 1 min; 72 °C x 1 min (28 ciclos) e 60 °C x 60 min (1 ciclo) em um termociclador Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Os produtos foram separados por eletroforese capilar de alta resolução em sequenciador automático ABI 310 Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os perfis alélicos foram determinados utilizando os programas GeneScan Analysis 3.7 e Genotyper 3.7 softwares (Applied Biosystems).

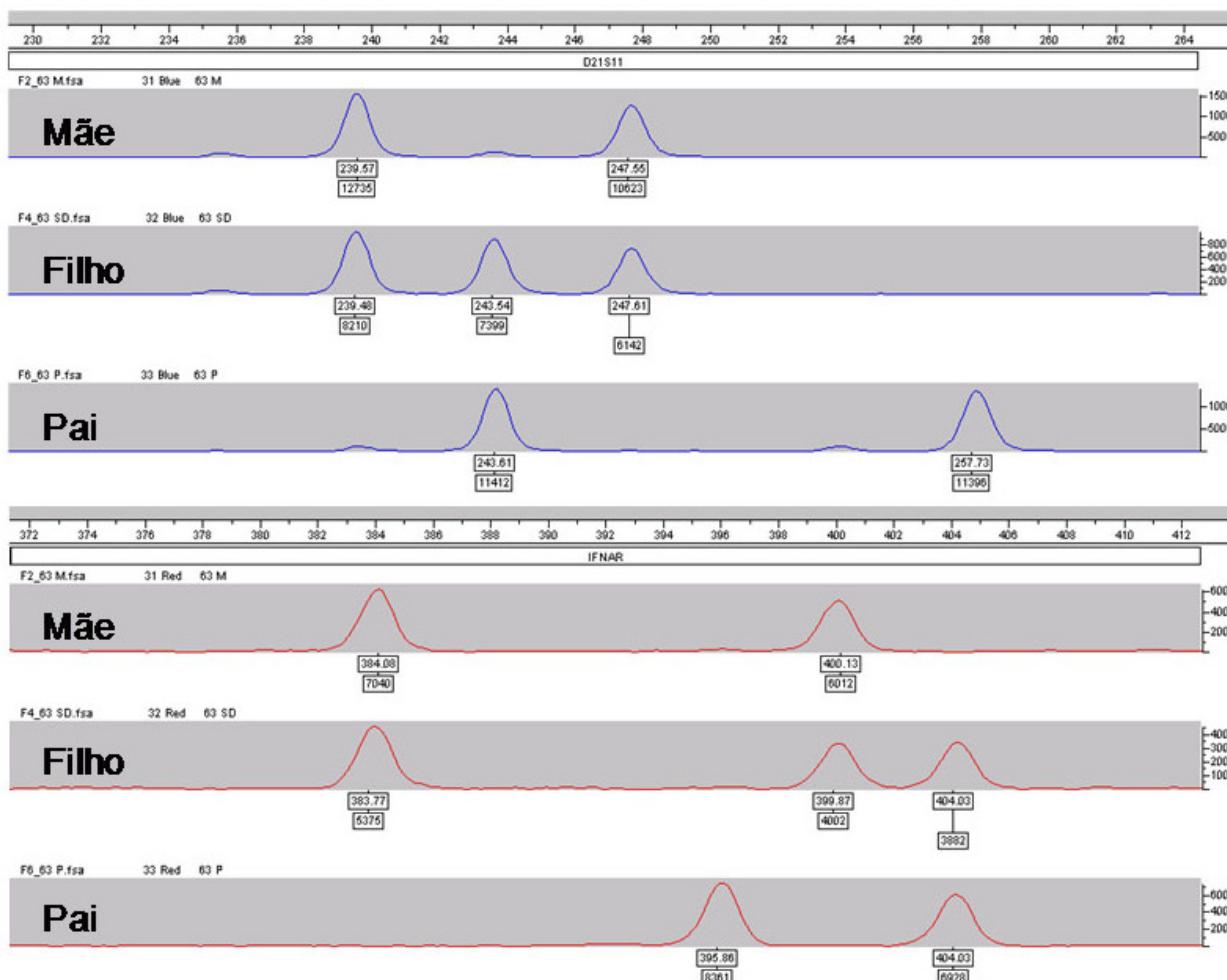
**Incidência e cobertura do atendimento:** A incidência de Síndrome de Down e a cobertura diagnóstica no município de Campos dos Goytacazes foram estimadas por contagem direta do número de acometidos nascidos no período do estudo e que tiveram

teste de DNA positivo para trissomia 21, considerando as taxas de natalidade para o município conforme dados base do ano 2005 do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC)<sup>35</sup>. Foram determinadas as freqüências de casos de nascidos vivos relacionando a idade da mãe para faixas: menor de 10, 10-14, 15-19, 20-24, 25-29, 30-34 anos e 35-46 anos.

## Resultados

Para a implantação do teste de DNA para trissomia 21 e a sua subsequente oferta ao público foi necessário padronizar laboratorialmente a metodologia de tipagem molecular com marcadores microsatélites cromossomo 21-específicos pelo ensaio multiplex (*i.e.*, em tubo único) da QF-PCR. Um eletroferograma de

um ensaio representativo do exame para um núcleo familiar com um acometido pela trissomia 21, em que o estado heterotrisômico (perfil trialélico) é revelado, é mostrado na figura 2. O simples confronto dos perfis alélicos do acometido com os respectivos progenitores permite a rápida e inequívoca identificação da origem parental da cópia extra do cromossomo 21 (neste exemplo, a origem é materna).



**Figura 2**

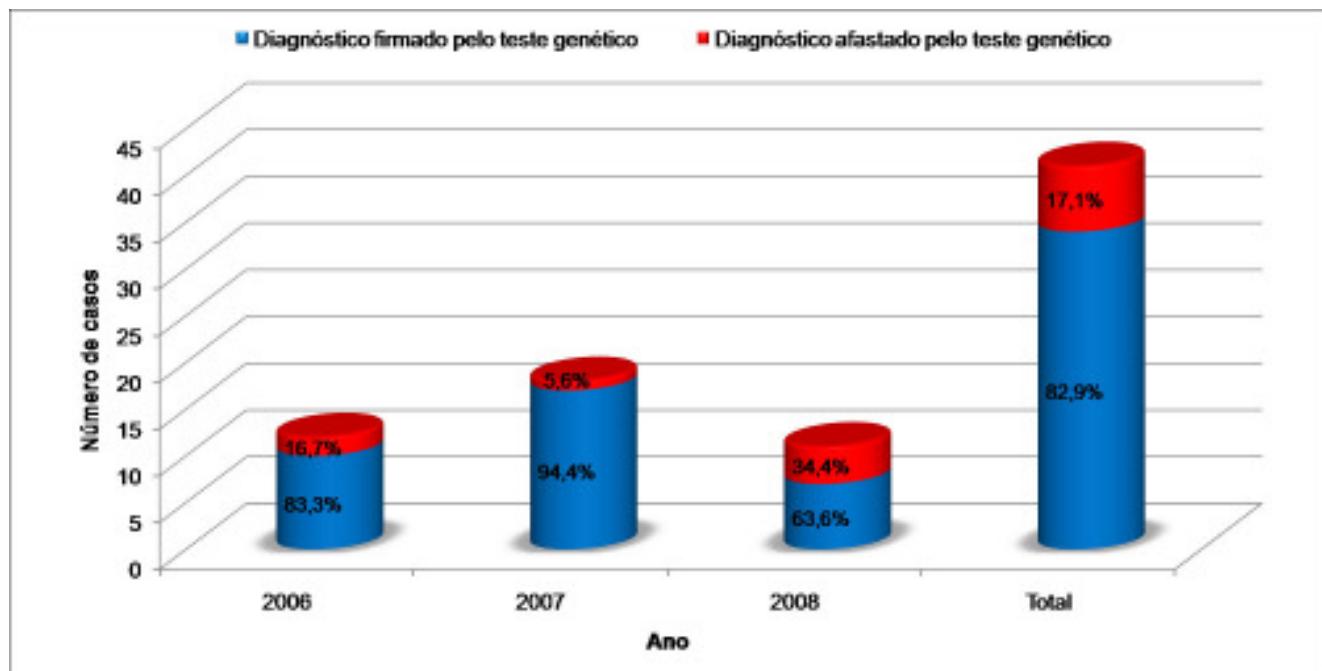
Eletroferogramas representativos do ensaio de citogenética molecular pela reação multiplex quantitativa fluorescente em cadeia da polimerase (QF-PCR) em um núcleo familiar com um acometido pela trissomia 21. O acometido (Filho) apresenta um perfil trialélico para os marcadores polimórficos analisados, revelando o seu estado heterotrisômico. Dois alelos maternos distintos são encontrados no acometido, D21S11 (alelos 239 e 247) e IFNAR (alelos 384 e 400). Os nomes dos alelos são os tamanhos em pares de bases dos produtos de amplificação. Os nomes dos marcadores são indicados acima de cada eletroferograma.

O potencial diagnóstico do teste de DNA padronizado foi validado experimentalmente mediante testes de concordância em sessenta núcleos familiares com um acometido pela Síndrome de Down e cuja condição trissômica tinha sido confirmada pelo teste padrão ouro da cariotipagem por banda G. Os testes de concordância foram feitos em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e serão objetos de uma futura publicação. Em conjunto, esses estudos renderam três trabalhos de conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas<sup>36,37</sup>.

O teste de DNA para trissomia 21 foi oferecido gratuitamente ao público em janeiro de 2006, inicialmente para atender a demanda esporádica do Ambulatório e Enfermarias Pediátricas do Hospital Escola Álvaro Alvim, e gradualmente disponibilizado às maternidades

de Campos de Goytacazes. Os hospitais Sociedade Portuguesa de Beneficência de Campos e Santa Casa de Misericórdia de Campos rapidamente reconheceram as vantagens do teste rápido no acompanhamento do acometido, constituindo hoje as fontes primárias da nossa base estatística. As UTIs Neonatais do Hospital dos Plantadores de Cana e da Clínica Cirúrgica e Maternidade Lília Neves aderiram mais recentemente.

O demonstrativo do atendimento para o período 2006-2008 é apresentado na figura 3. No total foram referidos 41 pacientes com suspeita de Síndrome de Down; em média foram atendidos 14 casos por ano. Trinta e quatro dos casos (82,9%) tiveram a suspeita confirmada pelo teste de DNA para trissomia 21. Um caso foi discordante do resultado do exame citogenético de banda G e está sob investigação para confronto.

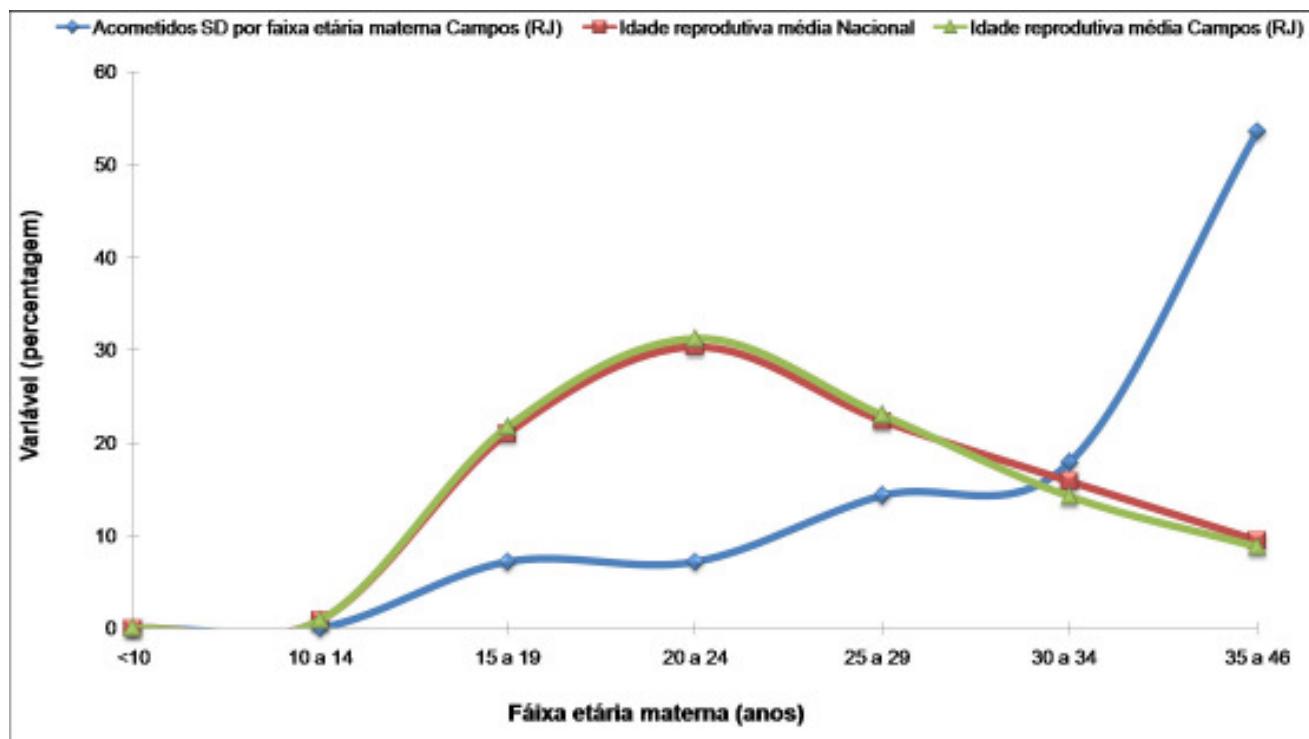


**Figura 3**

Distribuição do atendimento e cobertura do diagnóstico genético para Síndrome de Down no município de Campos dos Goytacazes (período 2006-2008).

Considerando a taxa média de 7874<sup>35</sup> nascidos vivos por ano para o município, a taxa anual de incidência de casos de Síndrome de Down é de 1 em 695 nascidos vivos. Considerando as faixas etárias das mães, observamos uma distribuição com leve tendência bimodal (Figura 4), em que 32% dos acometidos

nasceram de mulheres com idades entre 25 a 34 e 54% de mulheres com idade > 35 anos, confirmado que esta última faixa etária reprodutiva materna é fator preponderante de risco para não disjunção cromossômica.



**Figura 4**

Freqüência de nascidos vivos com Síndrome de Down (SD) na população de estudo por intervalo da idade materna. Para efeitos de comparação foram incluídos os dados de natalidade (NV) para o Brasil, para os municípios de Campos dos Goytacazes e São José do Rio Preto<sup>35</sup> e a freqüência de Síndrome de Down por faixa etária materna na Inglaterra para o mesmo período (NDSCR, 2007). Esses resultados sugerem, diferentemente ao descrito para Inglaterra, que o grande número de mães jovens (< 35 anos) com gestações acometidas pela Síndrome de Down no Brasil está diretamente relacionado com uma maior taxa de natalidade nesta faixa etária.

## Discussão

Embora deva ser considerada indicativa, em princípio, a incidência de um acometido pela Síndrome de Down em 695 nascidos vivos por ano estimada no presente trabalho é comparável às taxas relatadas para os Estados Unidos (1/732)<sup>38</sup> e a Inglaterra (1/1000)<sup>4</sup> determinadas em estudos de âmbito nacional. Atenta-se ao fato que as freqüências reportadas pelos estudos na Inglaterra são determinadas considerando a distribuição da idade materna, a disponibilidade efetiva do diagnóstico pré-natal e a terminação (90%) legalizada dos conceitos afetados.

Na ausência de diagnóstico pré-natal e terminação da gravidez, como no presente estudo, é importante considerar as perdas naturais fetais por causa desta anomalia cromossômica, que estão previstas

em > 70%<sup>2,3,4,5</sup>. Em conjunto, estes dados sugerem uma prevalência anual média de 38 concepções afetadas para o município, das quais 11 a 12 chegam a termo.

A distribuição dos acometidos por faixa etária reprodutiva materna exibiu uma leve tendência bimodal para as faixas etárias maternas 25-34 e >35 anos. A tendência bimodal foi, porém, menor que a relatada por Gusmão e colaboradores, obtida a partir de uma maior população de acometidos do Estado da Bahia, que exibiu maior proporção de acometidos nascidos de mulheres nas faixas etárias maternas 25-29 e 35-39 anos<sup>34</sup>. Não obstante, as diferenças no desenho experimental (no presente estudo de incidência, e de

prevalência no estudo de Gusmão e colaboradores), ambas as distribuições diferem da distribuição de casos em países desenvolvidos como na Inglaterra<sup>1</sup> e nos Estados Unidos<sup>39, 40</sup>, onde virtualmente a maioria dos acometidos nasce de mães > 35 anos de idade, que é a faixa etária considerada de risco para não disjunção cromossômica<sup>31, 41</sup>.

Os nossos dados sugerem a princípio um leve risco bimodal para Síndrome de Down na população de estudo. Essa distribuição, porém deve ser interpretada com cautela, em face das notórias diferenças observadas nas taxas de natalidade por faixa etária materna entre os países desenvolvidos e os em via de desenvolvimento. A curva de natalidade por faixa etária reprodutiva materna para a população brasileira demonstra uma predominância de mães jovens (31% na faixa etária 20-24 anos), enquanto que em países desenvolvidos a proporção de nascidos vivos de mulheres > 35 anos é proporcionalmente aumentada<sup>42</sup>. Os dados apresentados ganham relevância epidemiológica nacional uma vez que a distribuição de nascidos vivos por faixa etária reprodutiva materna para Campos dos Goytacazes é praticamente indistinguível da média nacional (Figura 4). Os dados reafirmam, portanto, que a idade reprodutiva materna > 35 anos é risco para não disjunção cromossômica e que a associação entre idade materna mais jovem e ocorrência de trissomia 21 é aparente, visto que precisamente nessa faixa etária o índice de natalidade é mais elevado.

O valor do teste de DNA para trissomia 21 não deverá ultrapassar 50% do valor do exame padrão ouro (citogenética por banda G), que varia de R\$ 110,00 a R\$ 360,00. Por meio de convênios de prestação de serviço, os poderes públicos municipal e estadual poderiam oferecer o teste de DNA para trissomia 21 e inclusive estender a sua oferta ao atendimento pré-natal, evitando o diagnóstico tardio desta importante alteração genética.

Por último, quanto ao tipo de teste de DNA oferecido e à natureza prospectiva do estudo, o pioneirismo do presente esforço

não é só nas esferas municipal e regional, mas nacional, pois não há outro laboratório no Brasil que disponibilize esse teste de DNA específico. Em países como Inglaterra, Espanha e Estados Unidos é disponibilizada a mesma metodologia, porém no pré-natal<sup>7, 8, 9, 43</sup>.

## Conclusões

O teste de DNA multiplex da QF-PCR permitiu firmar ou afastar a suspeita clínica dos pacientes pediátricos com resultados obtidos em até 48 horas da coleta da amostra biológica (média de 7 dias de entrega de resultados). Considerando como referência as taxas dos estudos internacionais, a incidência estimada (1/695) neste trabalho representa uma cobertura diagnóstica próxima à totalidade dos casos para o período no município. A citogenética molecular pode ser utilizada como teste diagnóstico preciso e rápido da trissomia 21 e, portanto, de fácil inserção pelos serviços de monitoramento, diagnóstico e de atendimento de referência. A sua utilidade em diagnóstico pré-natal deverá ser explorada de maneira a fornecer dados de números anuais de conceitos e nascimentos de acometidos que possam contribuir para um melhor planejamento das ações que visam à saúde, educação e ao atendimento social no município.

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes e às famílias que participaram desta iniciativa regional, assim como aos médicos que referenciaram o serviço. O trabalho recebeu apoio logístico do Hospital Escola Álvaro Alvim e econômico do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular - NUDIM, interveniente do termo aditivo ao convênio nº 020 entre a Fundação Benedito Pereira Nunes e a Universidade Estadual do Norte Fluminense.

## Referências bibliográficas

1. 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: 2-6.
2. Hook EB, Mutton DE, Ide R, Alberman E, Bobrow M. The natural history of Down syndrome conceptuses diagnosed prenatally that are not electively terminated. Am J Hum Genet 1995; 57: 875-881.
3. Morris JK, Wald NJ, Watt HC. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. Prenat Diagn 1999; 19: 142-145.
4. Alberman E. The National Down Syndrome Cytogenetic Register (NDSCR). J Med Screen 2002; 9: 97-98.
5. Savva GM, Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Maternal age-specific fetal loss rates in Down syndrome pregnancies. Prenat Diagn 2006; 26: 499-504.
6. Shaw SW, Hsu JJ, Lee CN, Hsiao CH, Chen CP, Hsieh TT et al. First- and second-trimester Down syndrome screening: current strategies and clinical guidelines. Taiwan J Obstet Gynecol 2008; 47: 157-162.
7. Adinolfi M, Sherlock J. Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR. Lancet 2001; 358: 1030-1031.
8. Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. Mol Hum Reprod 2004; 10: 839-846.
9. Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). J Histochem Cytochem 2005; 53: 285-288.
10. Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. Am J Hum Genet 2005; 76: 91-99.
11. Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M et al. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. PLoS Genet 2008; 4: e1000033.
12. Mutton D, Alberman E, Hook EB. Cytogenetic and

- epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists. *J Med Genet* 1996; 33: 387-394.
13. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Study of Down syndrome in 238,942 consecutive births. *Ann Genet* 1998; 41: 44-51.
  14. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 725-738.
  15. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 280-291.
  16. Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2008; 1: 21.
  17. Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RM, Rindfuss PA et al. A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 1999; 104: 23-28.
  18. Peterson A, Patil N, Robbins C, Wang L, Cox DR, Myers RM. A transcript map of the Down syndrome critical region on chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1735-1742.
  19. Lynn A, Kashuk C, Petersen MB, Bailey JA, Cox DR, Antonarakis SE et al. Patterns of meiotic recombination on the long arm of human chromosome 21. *Genome Res* 2000; 10: 1319-1332.
  20. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4997-5001.
  21. Olson LE, Richtsmeier JT, Leszl J, Reeves RH. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* 2004; 306: 687-690.
  22. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; 405: 311-319.
  23. McElhinney DB, Straka M, Goldmuntz E, Zackai EH. Correlation between abnormal cardiac physical examination and echocardiographic findings in neonates with Down syndrome. *Am J Med Genet* 2002; 113: 238-241.
  24. Baptista MJ, Fairbrother UL, Howard CM, Farrer MJ, Davies GE, Trikka D et al. Heterotrisomy, a significant contributing factor to ventricular septal defect associated with Down syndrome? *Hum Genet* 2000; 107: 476-482.
  25. Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 2001; 3: 91-101.
  26. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet* 2006; 2: e50.
  27. Petronis A. Alzheimer's disease and down syndrome: from meiosis to dementia. *Exp Neurol* 1999; 158: 403-413.
  28. Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28: 55-76.
  29. Brookes ME, Alberman E. Early mortality and morbidity in children with Down's syndrome diagnosed in two regional health authorities in 1989. *J Med Screen* 1996; 3: 7-11.
  30. Friedman JM. Racial disparities in median age at death of persons with Down syndrome—United States, 1968-1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001; 50: 463-465.
  31. Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE. Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 273-280.
  32. Castilla EE, Rittler M, Dutra MG, Lopez-Camelo JS, Campana H, Paz JE et al. Survival of children with Down syndrome in South America. ECLAMC-Downsurv Group. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations. *Am J Med Genet* 1998; 79: 108-111.
  33. Beiguelman B, Krieger H, SILVA LM. Maternal age and Down syndrome in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Genética* 1996; 19: 637-640.
  34. Gusmao FA, Tavares EJ, Moreira LM. [Maternal age and Down syndrome in Northeast Brazil]. *Cad Saude Publica* 2003; 19: 973-978.
  35. DATASUS, *Dados sobre nascidos vivos em Brasil período 1994-2005 (dados distribuídos pelo Departamento de Análise de Situação, Saúde da Secretaria de Vigilância em Saúde, em conjunto com as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, e obtidos pelo site do Ministério da Saúde <http://www.datasus.gov.br>)*. SUS (Departamento de Informática do Serviço Único de Saúde), Editor. 2005: Brasília.
  36. Mattos GJA, *Investigação de anomalias genéticas utilizando a técnica da PCR quantitativa fluorescente*, in *Centro de Biociências e Biotecnologia*. 2006, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro: Campos dos Goytacazes. p. 96.
  37. da Silva AFA, *Recombinação em 21q dificulta a determinação da origem meiótica da não disjunção em portadores da Síndrome de Down*, in *Centro de Biociências e Biotecnologia*. 2007, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro: Campos dos Goytacazes. p. 75.
  38. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007; 13: 221-227.
  39. Egan JF, Benn PA, Zelop CM, Bolnick A, Gianferrari E, Borgida AF. Down syndrome births in the United States from 1989 to 2001. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1044-1048.
  40. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA et al. The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep* 2007; 122: 62-72.
  41. Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet* 2000; 57: 95-100.
  42. Crane E, Morris JK. Changes in maternal age in England and Wales—implications for Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract* 2006; 10: 41-43.
  43. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001; 358: 1057-1061.