



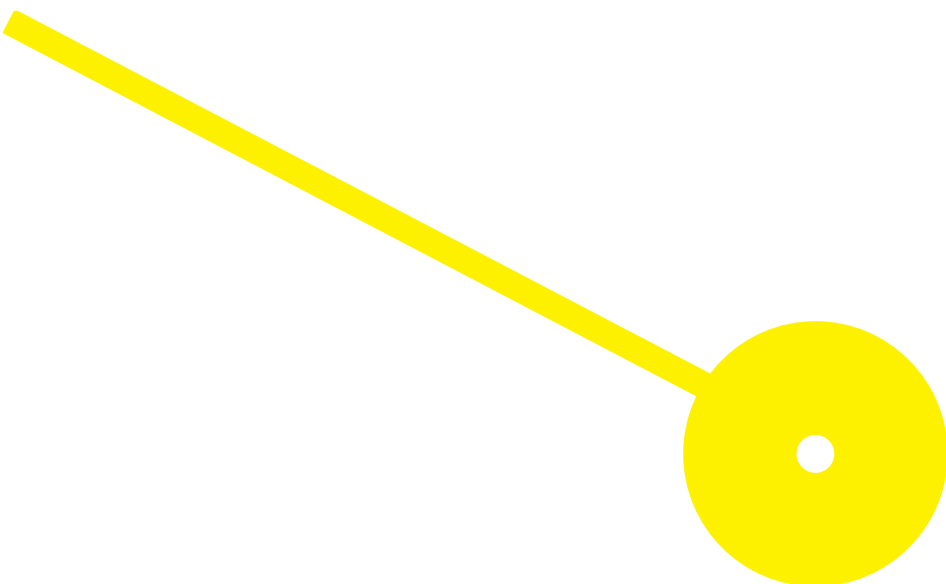
MESTRADO

Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Patologia Molecular

Teste pré-natal não invasivo (NIPT – Non-Invasive Pre-natal Test)

Adriana Marques

10/2021





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

Teste pré-natal não invasivo – (NIPT – Non-Invasive Pre-natal Test)

Autor

Adriana Isabel Barros Marques

Orientadores

Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha, PhD

Técnico Superior de Saúde – Especialista em Genética

Unidade de rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética – Departamento de Genética

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Regina Augusta Alves Pereira da Silva, PhD

Professora Coordenadora da Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Patologia Molecular pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Hugo Rocha, pela ajuda, pela partilha de conhecimentos e por toda a sua disponibilidade e prontidão. Os seus esclarecimentos, críticas e sugestões foram essenciais ao longo da elaboração desta dissertação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Regina Silva, por ter a generosidade de partilhar sempre a sua sabedoria e experiência, por toda a compreensão e apoio e por me ter feito acreditar na concretização desta dissertação, quando eu achava já não ser possível.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional e por me terem proporcionado sempre as melhores condições para evoluir a nível pessoal e profissional.

Ao Diogo, pelo constante encorajamento e incentivo e por toda a paciência e compreensão, essenciais nos momentos mais difíceis.

À minha irmã pelo seu interesse e entusiasmo, por ouvir sempre as minhas dúvidas e receios e por acreditar sempre em mim.

Aos meus amigos, pela amizade, cumplicidade e alegria contagiante.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e que estiveram sempre presentes ao longo deste desafio.

O meu sincero agradecimento a todos, que bonita viagem fizemos juntos!

Resumo

O diagnóstico pré-natal tem como objetivo a deteção precoce de anomalias cromossómicas, mas apenas é possível por meio de métodos de diagnóstico invasivos que acarretam o risco de perda fetal. A descoberta de ADN fetal livre na circulação materna, veio impulsionar o desenvolvimento de um teste pré-natal não invasivo (NIPT). Este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão da literatura sobre o atual estado da arte do NIPT. Para tal, foi feita uma pesquisa bibliográfica no PubMed, da qual foram selecionados os artigos de interesse.

Atualmente, o NIPT pode ser utilizado com confiança no rastreio pré-natal das aneuploidias mais comuns. Para tal, são utilizadas as tecnologias de sequenciação de nova geração, através de diferentes abordagens. Estudos confirmaram uma elevada sensibilidade e especificidade do NIPT em relação aos testes de rastreio bioquímico. Contudo, existem limitações que fazem ainda com que este teste não possa ser considerado um teste diagnóstico, carecendo de confirmação através de um teste invasivo.

Apesar de ser dispendioso, o NIPT encontra-se já implementado na prática clínica de diversos países, não sendo ainda disponibilizado pelo Sistema Nacional de Saúde em Portugal. Apesar de ter revelado várias potencialidades, existe ainda um caminho a percorrer para que possa vir a ser uma alternativa aos métodos de diagnóstico convencionais.

Palavras-chave: Diagnóstico pré-natal, métodos de rastreio no soro materno, teste pré-natal não invasivo, aneuploidia, ácidos nucleicos livres

Abstract

The prenatal diagnosis is used to detect chromosomal abnormalities at an early stage, but it is only possibly through invasive diagnostic methods that carry the risk of fetal loss. The discovery of free fetal DNA in maternal circulation allowed the development of a non-invasive prenatal test (NIPT). The purpose of this paper is to make a literary review of the current state of the art about NIPT. On that account, a bibliographic search was made on Pubmed, from which were selected the articles of interest.

The NIPT can currently be used with confidence on the prenatal screening of the most common aneuploidies. For that, new generation sequencing technologies are used, through different approaches. Studies confirm a high sensibility and specificity of NIPT when compared to biochemical screening tests. However, there are limitations that do not allow this test to be considered a diagnostic test, requiring confirmation with an invasive test.

Even though it is very expensive, NIPT has already been implemented in clinical practice in several countries but has not yet been implemented in Portugal. Despite all the revealed potentialities, there's still a way to go for NIPT to be considered an alternative to the conventional diagnostic methods.

Keywords: prenatal diagnosis, maternal serum screening methods, noninvasive prenatal testing, aneuploidy, cell-free nucleic acids

Índice

1. Introdução	1
1.1. História da Citogenética Humana.....	1
1.2. Cromossomas	2
1.2.1 Nomenclatura dos cromossomas.....	3
1.1. Alterações cromossómicas.....	3
1.3.1 Alterações cromossómicas numéricas.....	4
1.3.2 Alterações cromossómicas estruturais.....	10
1.4. Conceito de Rastreio Pré-Natal.....	12
1.4.1 Tipos de rastreio e marcadores bioquímicos no soro materno.....	13
1.5. Métodos de diagnóstico pré-natal invasivos.....	16
1.5.1 Amniocentese.....	17
1.5.2 Cordocentese.....	18
1.5.3 Biópsia das vilosidades coriónicas	18
1.6. Citogenética convencional.....	18
1.6.1. Cultura celular.....	19
1.6.2. Manipulação celular.....	19
1.6.3. Coloração e bandagem.....	19
1.6.4. Análise microscópica.....	20
1.7. Genética molecular.....	20
1.7.1. Fluorescence in situ hybridization - FISH	20
1.7.2. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction – QF-PCR.....	21
1.7.3. Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA.....	22
1.7.4. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH).....	23
1.8. Objetivos.....	24
2. Métodos	25
3. Resultados	26

3.1. Teste pré-natal não invasivo.....	26
3.1.1. ADN fetal livre.....	26
3.1.2. Tecnologias do NIPT.....	29
3.1.3. Aplicações na prática clínica.....	40
3.1.4. Vantagens e desvantagens	43
3.1.5. Limitações.....	44
3.1.6. Modelos de implementação na prática clínica e relação custo-efetividade.....	45
4. Discussão.....	48
5. Referências Bibliográficas.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema da não disjunção meiótica e mitótica.....	5
Figura 2 – Cariótipo de um feto do sexo masculino com Trissomia 21.....	6
Figura 3 – Características físicas de um indivíduo portador de síndrome de Down.....	8
Figura 4 – Cariótipo de um recém-nascido do sexo masculino com trissomia 18.....	9
Figura 5 – Cariótipo de um indivíduo portador de trissomia 13.....	10
Figura 6 – Ilustração do procedimento amniocentese.....	18
Figura 7 – Etapas da técnica de FISH.....	22
Figura 8 – Representação esquemática das etapas da técnica de MLPA.....	23
Figura 9 – Esquema das etapas da técnica de aCGH.....	25
Figura 10– Ilustração de sangue materno com elementos fetais em circulação.....	28
Figura 11 – Variação da fração fetal ao longo da gestação de um feto saudável, com T21, T18 e T13.....	29
Figura 12 – Esquema do processo de sequenciação do sistema GS20 454.....	30
Figura 13 – Esquema ilustrativo da comparação das abordagens s-MPS e t-MPS.....	34
Figura 14 – <i>Shotgun massively parallel sequencing</i> para a deteção prenatal não invasiva de aneuploidias fetais.....	35
Figura 15 – Comparação das estratégias de NGS mais utilizadas no âmbito do NIPT.....	37
Figura 16 – Diferentes modelos propostos para a implementação do NIPT na prática clínica.....	44

Lista de abreviaturas

aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
AFP	Alfa-fetoproteína
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
BVC	Biópsia das vilosidades coriônicas
CNVs	<i>Copy-number variations</i>
DPN	Diagnóstico Pré-Natal
DGS	Direção Geral de Saúde
cffDNA	DNA fetal livre
μ E3	Estriol não conjugado
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
β HCG	Fração beta da gonadotrofina coriônica humana
FF	Fração fetal
INDELS	<i>Insertions and deletions</i>
IVG	Interrupção voluntária da gravidez
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PAPP-A	Proteína plasmática A associada à gravidez
QF-PCR	<i>Quantitative fluorescence polymerase chain reaction</i>
NOR	Região organizadora do núcleo
RENAC	Registo Nacional de anomalias congénitas
s-MPS	<i>Shotgun massively parallel sequencing</i>
SMRT	<i>Single molecule real time</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SVs	<i>Structural variations</i>
t-MPS	<i>Targeted massively parallel sequencing</i>
NIPT	Teste pré-natal não invasivo
TN	Translucência da nuca
T21	Trissomia 21
T18	Trissomia 18
T13	Trissomia 13
ZMW	<i>Zero-mode waveguide</i>

1. Introdução

1.1. Citogenética Humana

O estudo da citogenética humana teve início com a descoberta dos cromossomas humanos, que foram observados pela primeira vez por Walther Flemming em 1882, ano em que publicou a primeira ilustração de um cromossoma. Contudo, a designação “cromossoma”, que vem da junção das palavras gregas “Khroma” que significa cor e “soma” que significa corpo, apenas foi atribuída por Wilhelm Waldeyer, em 1888, devido ao facto de várias experiências terem demonstrado que os cromossomas eram estruturas facilmente coradas.¹

Em 1903, Sutton e Boveri elaboram formalmente a teoria da hereditariedade cromossómica, explicando os fundamentos subjacentes às leis de Mendel que explicam a transmissão das características hereditárias². Sutton denominou a citogenética como o ramo da Biologia que se dedica ao estudo dos cromossomas. Apesar do grande desenvolvimento de corantes, lentes óticas e técnicas de manipulação que ocorreu no início do século XX, o material de estudo utilizado (biópsias, tecidos ou amostras maceradas de células tumorais) e a escassa tecnologia disponível impediam uma contagem reprodutível dos cromossomas, o que levou a várias publicações com números contraditórios. Em 1912, Von Winiwarter refere a existência de 47 cromossomas no homem e 48 cromossomas na mulher e em 1923, Painter reporta que o número de cromossomas da espécie humana seria 48, e reconhece a existência dos cromossomas sexuais X e Y^{1,2}. Este número foi aceite até ao início da década de 50, altura em que ocorreram avanços tecnológicos que culminaram na descoberta do número correto de cromossomas humanos. Um deles foi feito por Hsu, em 1952, de forma acidental². Hsu já havia sugerido que o estudo dos cromossomas fosse feito em culturas celulares ao invés de cortes de tecidos. Por lapso, num dos seus procedimentos experimentais, Hsu efetuou a lavagem das culturas celulares com uma solução hipotónica em vez de uma solução isotónica, o que provocou a turgescência das células e consequentemente a dispersão dos cromossomas, o que facilitou a sua observação. Com base na descoberta de Hsu, em 1956, Tijo e Levan conseguiram obter preparações de células embrionárias com qualidade suficiente, que lhes permitiu fazer uma contagem correta e consistente do número de cromossomas³. Assim, foi reportado por Tijo e Levan num artigo na revista *Hereditas*, que o número cromossómico humano seria de 46³. Ford e Hamerton confirmaram o mesmo, no mesmo ano, em células somáticas testiculares⁴. A descoberta do número correto de cromossomas da espécie humana possibilitou que se aplicasse este conhecimento no estudo de patologias humanas e em 1959, Jérôme Lejeune descreveu a presença de um cromossoma supranumerário reportando pela primeira vez um caso de trissomia que viria a ser conhecida como Síndrome de Down^{2,4}. A partir de então foram descobertas e reportadas várias outras anomalias

cromossômicas, à medida que a constante investigação permitia significativos avanços tecnológicos e científicos⁴.

1.2 Os Cromossomas

Os cromossomas são estruturas cuja unidade básica é a cromatina, que por sua vez é composta por ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas. Estas proteínas que compõe a cromatina denominam-se de histonas⁵. As histonas são proteínas pequenas e altamente conservadas, que estão presentes em grande quantidade e que formam em conjunto com o DNA, as unidades básicas e fundamentais da cromatina, os nucleossomas – complexos DNA proteína. Por serem carregadas positivamente, devido à sua elevada composição em lisina e arginina, as histonas ligam-se intimamente ao DNA, funcionando como a matriz sob a qual este se enrola⁵. Além disso, as histonas desempenham variadas funções, controlando o acesso de elementos reguladores do DNA durante os processos de replicação, reparação e transcrição etc. Existem também as proteínas não histónicas, que para além de também intervirem na condensação dos cromossomas, funcionam muitas vezes como enzimas e atuam na regulação da atividade génica¹. A cromatina pode ser dividida em duas classes: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é descondensada e estendida e representa a zona com maior atividade do genoma. A heterocromatina é mais condensada e representa regiões menos ativas e/ou inativas do genoma, e divide-se em heterocromatina constitutiva ou facultativa. A heterocromatina constitutiva é constituída por sequências de DNA repetitivas e é na maioria das vezes inativa, localizando-se na região pericentromérica de todos os cromossomas e na extremidade distal do cromossoma Y. A heterocromatina facultativa é constituída por DNA não repetitivo e resulta de mecanismos de silenciamento genético, podendo ser descompactada tornando-se transcricionalmente ativa².

O DNA de uma célula humana é bastante extenso, daí a necessidade da sua compactação. Durante o ciclo celular, verifica-se uma grande variabilidade na conformação e no grau de compactação dos cromossomas. É na metáfase, uma das fases da mitose, que os cromossomas apresentam um grau de compactação que permite a sua visualização ao microscópio, possibilitando assim o seu estudo citogenético⁵.

Cada núcleo de uma célula somática humana normal contém 23 pares de cromossomas distintos, sendo 44 autossomas e dois heterossomas (cromossomas sexuais). Estruturalmente, os cromossomas são compostos por dois cromátídeos irmãos, e compreendem três regiões funcionais: o telómero, o centrómero e a região organizadora do núcleo (NOR)².

O centrómero é uma constrição primária que une duas cromátídeas irmãs. O centrómero permite também a união entre os dois braços do cromossoma, sendo o braço mais pequeno designado por p (de

petit) e localizado para cima do centrômero, e o mais longo por q (por ser a letra seguinte do alfabeto) e localizado para baixo do centrômero. É constituído maioritariamente por DNA satélite e contém o cinetocoro, uma estrutura proteica complexa, através da qual os cromossomas se ligam ao fuso acromático¹.

Os telómeros são estruturas especializadas, localizadas na região terminal do cromossoma, que contém repetições em *tandem* da sequência nucleotídica TTAGGG. Estas estruturas desempenham funções essenciais como: mantêm a integridade estrutural do cromossoma, ajudam no emparelhamento cromossómico inicial na meiose, ajudam no posicionamento dos cromossomas no núcleo e asseguram a replicação completa do DNA².

A NOR encontra-se nos *stalks* dos satélites dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos e têm como principais funções a participação na formação do nucléolo e a codificação do RNA ribossomal⁵.

1.2.1 Nomenclatura dos cromossomas

Dado que existem 46 cromossomas nas células Humanas, com o tempo surgiu a necessidade de os organizar e agrupar de modo a descrevê-los de uma forma única, simples e universal. Assim, após várias convenções e conferências internacionais surgiram os pressupostos nos quais se baseia a nomenclatura cromossómica. De acordo com esses mesmos pressupostos, os cromossomas classificam-se com base no tamanho, padrão de bandas e posição do centrômero⁵. Os autossomas são organizados do 1 ao 22 por ordem decrescente de tamanho (com exceção do cromossoma 22 que é maior que o 21) e os cromossomas sexuais são denominados de X e Y. Consoante a posição do centrômero os cromossomas são classificados como acrocêntricos – centrômero junto a uma extremidade, metacêntricos – centrômero no centro, ou muito perto do centro e submetacêntricos – centrômero entre o meio e a extremidade. Os braços são divididos em regiões tendo como referência o centrômero, os telómeros e as bandas características, e a numeração das bandas é feita sequencialmente do centrômero para o telómero, em cada um dos braços⁵.

1.1. Alterações cromossómicas

As anomalias cromossómicas definem-se como alterações no número e/ou estrutura normal dos cromossomas, e são a causa de uma percentagem significativa de doenças humanas, afetando cerca de 20% das gestações, onde a maioria termina em aborto espontâneo¹. Isto acontece porque na sua grande maioria, as anomalias cromossómicas traduzem-se em expressões fenotípicas tão graves que são incompatíveis com a vida. Estas anomalias podem ser classificadas de constitucionais ou adquiridas. As anomalias cromossómicas constitucionais são as que ocorrem antes ou pouco depois da fecundação, e já

existem no indivíduo aquando do seu nascimento. As anomalias cromossómicas adquiridas são as que surgem ao longo da vida do indivíduo e que resultam normalmente de um processo de carcinogénese. As consequências de uma alteração nos cromossomas são diversas e vão depender do tamanho do cromossoma afetado, do facto de ser um autossoma ou heterossoma, entre outros fatores². Geralmente as anomalias cromossómicas são classificadas em dois grandes grupos: numéricas e estruturais.

1.3.1 Alterações cromossómicas numéricas

Uma alteração cromossómica numérica define a condição em que há um aumento ou diminuição do número normal de cromossomas. Este tipo de anomalias são a principal causa de aborto, sendo responsáveis por aproximadamente 35-45% dos abortos espontâneos e por cerca de 4% dos nados mortos. As causas subjacentes a estas alterações são muito variáveis mas associam-se principalmente a erros na divisão celular. As anomalias cromossómicas numéricas podem ser classificadas como poliploidias ou aneuploidias⁵.

Poliploidia

As poliploidias são alterações numéricas em que o número de cromossomas resultante é múltiplo do número haplóide (n), sendo as mais comuns as triploidias ($3n$) e as tetraploidias ($4n$). A maioria das triploidias ocorre devido à fecundação de um ovócito por dois espermatozóides haplóides. A fecundação de um ovócito diplóide por ausência de redução meiótica, ou a fecundação por um espermatozóide diplóide são outras das possíveis causas. Estas alterações são habitualmente letais, existindo raras exceções em que o feto sobrevive até ao nascimento, mas nasce com anomalias na maioria dos órgãos, não sobrevivendo por muitos dias¹⁵.

Aneuploidia

Um organismo uni ou pluricelular que apresenta o número normal de cromossomas para a sua espécie diz-se ser euplóide. Por outro lado, quando ocorre uma alteração no número normal de cromossomas, em que há ganho ou perda de um número de cromossomas inferior ao número haplóide, estamos perante uma aneuploidia, surgindo um organismo aneuplóide. As aneuploidias ocorrem normalmente devido a erros nos mecanismos de divisão celular tais como a não disjunção na meiose ou na mitose (Figura 1), ou o atraso na migração do cromossoma durante a anafase¹. O risco de aneuploidia aumenta com a idade materna, sendo que estas representam a maior causa de aborto espontâneo (cerca de 50%) e de morte neonatal^{5,6}.

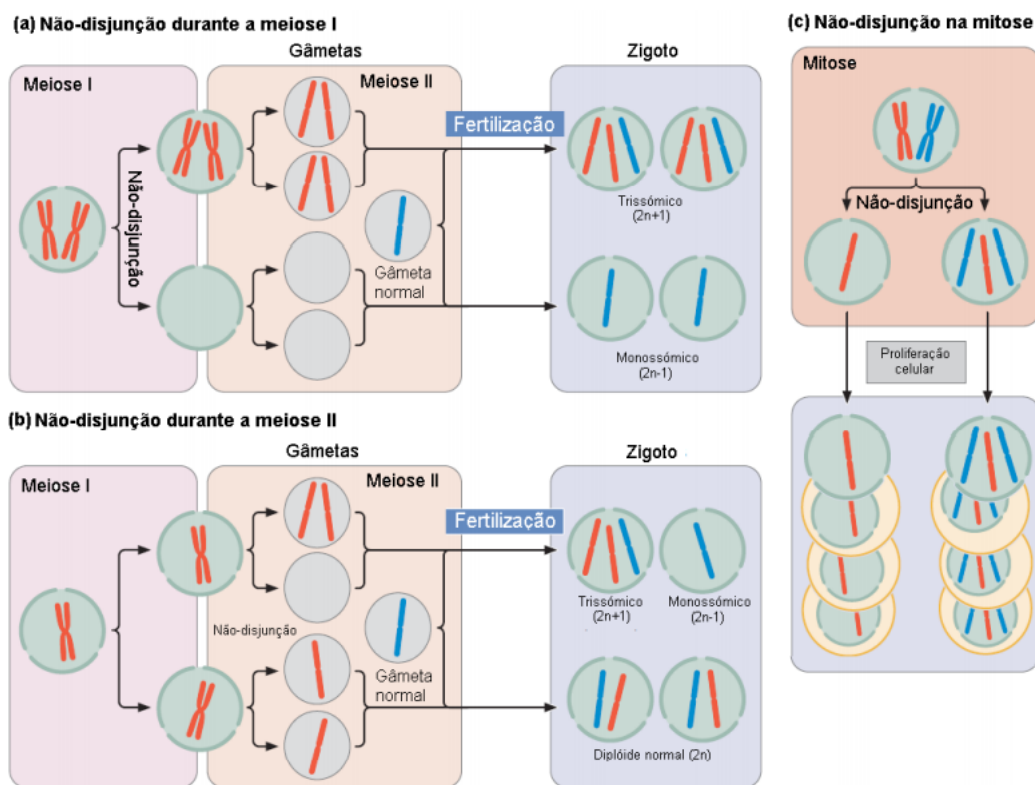


Figura 1 – Esquema da não disjunção meiótica e mitótica. (a) não disjunção durante a meiose I, o que vai originar gametas dissómicos e nulissómicos. (b) não disjunção durante a meiose II, o que origina dois gametas normais, um nulissómico e um dissómico. (c) a não disjunção mitótica origina duas linhas celulares (trissómica e monossómica). Adaptado de (6).

De acordo com Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC), as anomalias congénitas mais prevalentes são aneuploidias autossómicas, nomeadamente as trissomias 13, 18 e 21, sendo esta última a mais frequente⁷. A gravidade das trissomias autossómicas é diretamente proporcional ao tamanho dos cromossomas envolvidos¹. Isto deve-se ao facto de quanto maior for o cromossoma, maior o número de

genes envolvidos, e como tal, maior o número de consequências patológicas resultantes. Existe uma forte associação entre a idade materna e o risco do feto ter uma trissomia⁸.

1.3.1.1 Trissomia 21

A Trissomia 21 (T21) é uma aneuploidia que se caracteriza pela presença de um cromossoma extra no par de cromossomas 21 (Figura 2). Esta condição genética foi descrita pela primeira vez em 1866 por John Langdon Down, motivo pelo qual é também conhecida como síndrome de Down⁸. Mais tarde, em 1909, Shuttleworth descobriu a associação entre a idade materna avançada e um aumento do risco para esta condição^{1,8}.

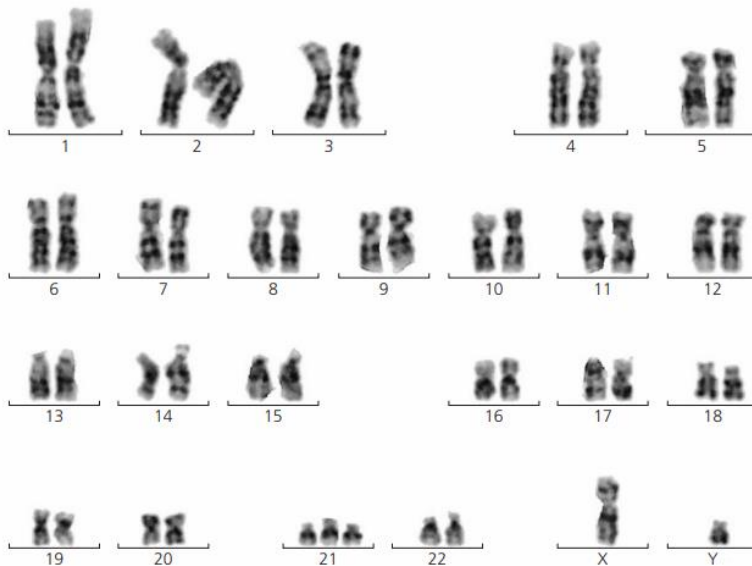


Figura 2 – Cariótipo de um feto do sexo masculino com Trissomia 21. Adaptado de (1)

A T21 é a aneuploidia mais frequente na população, tendo uma prevalência de 1/1660, contudo, esta prevalência aumenta de forma muito significativa com o aumento da idade materna⁹. O diagnóstico de síndrome de Down é confirmado após estudo citogenético, que permite verificar a presença de um cromossoma 21 extra.

Em 90% dos casos o cromossoma extra é de origem materna, e resulta maioritariamente da não disjunção na primeira divisão da meiose, embora em alguns casos possa ocorrer na segunda divisão da meiose^{1,8}. A idade materna tem uma grande influência na ocorrência da não disjunção, razão pela qual o risco para a síndrome de Down aumenta significativamente com o aumento da idade materna (tabela 1). Os mecanismos subjacentes a esta associação são alterações na recombinação meiótica, perda de coesão entre as cromátides, falhas no checkpoint do fuso mitótico e disfunções mitocondriais⁹. A idade

materna está mais associada ao risco de aneuploidias do que a idade paterna, porque a mulher apenas liberta um óvulo a cada ciclo menstrual enquanto o homem liberta milhares de espermatozóides a cada ejaculação, o que diminui a probabilidade de espermatozóides anómalos chegarem ao óvulo⁵.

Tabela 1 – Idade materna e risco para a síndrome de Down. Adaptada de (1)

Idade (anos)	Risco	Idade (anos)	Risco
20	1/1528	37	1/242
25	1/1351	38	1/189
30	1/909	39	1/146
31	1/796	40	1/112
32	1/683	41	1/85
33	1/574	42	1/65
34	1/474	43	1/49
35	1/384	44	1/37
36	1/307	45	1/28

Contudo, em alguns casos (5–7%), o cromossoma 21 extra tem origem na não-disjunção durante a meiose paterna e muito raramente (3–5% dos casos), a trissomia 21 tem origem em erros durante a mitose¹.

Numa pequena percentagem de casos de trissomia 21, cerca de 3% a 4%, estão presentes translocações robertsonianas, que ocorrem normalmente entre um cromossoma 21 e um dos cromossomas 13, 14 ou 15 ou entre um cromossoma 21 e um cromossoma 22 ou entre os dois cromossomas 21⁸. Estas translocações são maioritariamente “de novo” e ocorrem antes do *crossing-over* da primeira divisão da meiose. Nesta fase ocorre uma quebra no centrómero ou próxima deste nas sequências repetitivas do braço curto. Os fragmentos acêntricos resultantes desta quebra perdem-se, e os braços longos dos dois cromossomas unem-se pelas extremidades originadas pela quebra, dando origem a um novo cromossoma⁹.

Por vezes ocorrem também situações de mosaïcismo originadas frequentemente pela perda do cromossoma 21 extra em algumas células do embrião trissómico, ou, por vezes, pela não disjunção mitótica de um embrião inicialmente normal¹. Nestes casos, o indivíduo tem a presença de células normais e de células trissómicas, o que faz com que por vezes as manifestações clínicas sejam mais leves, o que vai depender muito não só da percentagem de células trissómicas presentes, como também do momento do desenvolvimento embrionário em que surge o mosaïcismo⁹.

A síndrome de Down conduz a uma expressão fenotípica específica, tendo os indivíduos afetados características comuns tais como: dismorfia facial, estatura baixa, rosto redondo, mãos e pés pequenos, pescoço curto e largo, entre outras (Figura 3).

Além disto, os indivíduos com síndrome de Down têm elevada probabilidade de desenvolver problemas de fala ou perturbações da linguagem, défice de força muscular e problemas de motricidade, perturbações do desenvolvimento intelectual e ainda cardiopatia congénita. A esperança média de vida dos portadores de síndrome de Down é menor do que na população em geral, contudo, tem vindo a aumentar graças a melhoria na qualidade dos cuidados e acompanhamento clínico prestado a estes indivíduos, podendo neste momento ultrapassar os 60 anos^{18,9}.

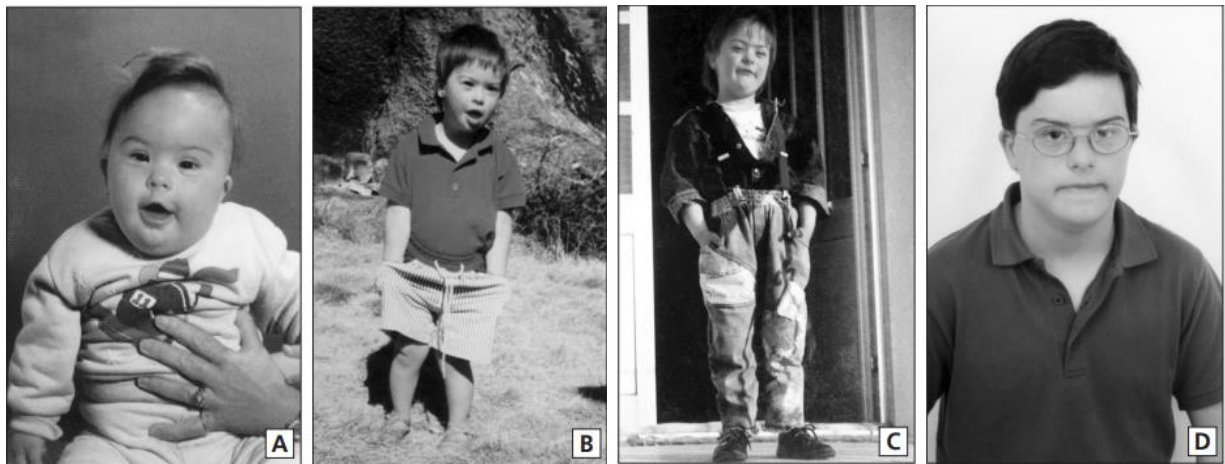


Figura 3 – Características físicas de um indivíduo portador de síndrome de Down: A – com sete meses de idade; B – com dois anos de idade; C – com 3 anos de idade e D – com 12 anos de idade. Adaptado de (1)

1.3.1.2 Trissomia 18

A trissomia 18 (T18), ou síndrome de Edwards, foi descrita pela primeira vez em 1960 e é a segunda trissomia mais frequente, caracterizando-se pela presença de três cromossomas 18¹ (Figura 4). A sua prevalência é de 1/8000 recém-nascidos e é três vezes mais comum no sexo feminino do que no masculino, o que se pensa estar relacionado com o facto de a taxa de perda fetal no caso dos fetos do sexo masculino ser superior comparativamente com os do sexo feminino, fazendo com que hajam mais nados vivos do sexo feminino. Aproximadamente 95% dos fetos abortam espontaneamente¹⁰. À semelhança da trissomia 21, a prevalência da trissomia 18 aumenta com o aumento da idade materna.

O cromossoma 18 supranumerário resulta geralmente da não-disjunção na meiose, podendo também ocorrer a trissomia parcial do braço curto ou do braço longo do cromossoma 18. Raramente as trissomias 18 têm como causa translocações ou mosaicismos embora também seja possível^{10,11}.

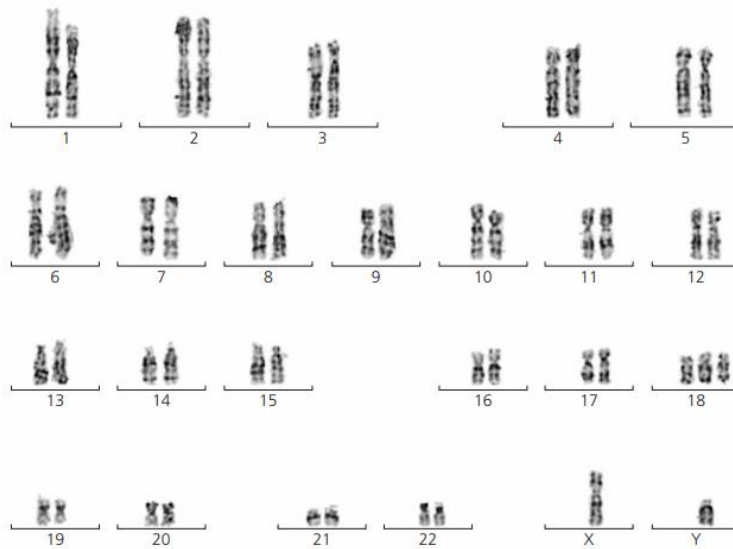


Figura 4 – Cariótipo de um recém-nascido do sexo masculino com trissomia 18. Adaptado de (1)

As consequências fenotípicas desta condição são múltiplas e severas pelo que as crianças que sobrevivem apresentam graves problemas de desenvolvimento mental e físico, o que leva a que a maioria não viva para além do primeiro ano¹⁰. As características mais comuns em crianças portadoras desta síndrome são: atraso no crescimento, micrognatia, occipital proeminente, orelhas baixas, pescoço fino, esterno curto entre outras. Ao nível dos órgãos apresentam frequentemente cardiopatias congénitas, malformações gastrointestinais, segmentação anormal dos pulmões, rim ectópico e rim em ferradura entre outras^{10,12}.

1.3.1.3 Trissomia 13

A trissomia 13 (T13), ou síndrome de Patau, caracteriza-se pela presença de um cromossoma extra no par 13 (Figura 5) e foi descrita em 1960¹. Há semelhança das restantes trissomias, o cromossoma extra presente na trissomia 13 tem origem sobretudo na não-disjunção meiótica, maioritariamente da mãe, sendo que em 20% dos casos está presente uma translocação robertsoniana¹².

Esta síndrome está associada a uma elevada mortalidade intra-uterina, e as crianças que nascem raramente sobrevivem para além dos seis meses de vida. Fenotipicamente, as características mais comuns são: polidactilia pós-axial, microcefalia, anomalias oculares, lábio leporino, fenda esfenopalatina, hérnia umbilical, entre outras^{1,12}.

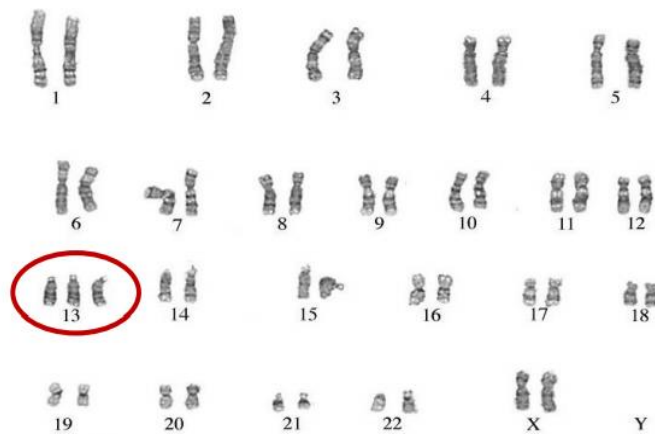


Figura 5 – Cariótipo de um indivíduo portador de trissomia 13.
[Fonte:http://worms.zoology.wisc.edu/zooweb/Phelps/47XX_13.html ,
acedido em 17/08/2021]

Clinicamente, as aneuploidias podem causar inúmeras consequências, desde leves a graves, sendo que no caso da T21, cerca de 43% das gestações afetadas terminam em aborto espontâneo ou nado-morto¹. Assim, e tendo em conta que as aneuploidias são a principal causa de morte perinatal e deficiência na infância, torna-se imperativa a sua deteção precoce, para assim se disponibilizar aconselhamento genético aos futuros pais. Deste modo, é desejável que o rastreio pré-natal de anomalias cromossómicas seja oferecido a todas as mulheres grávidas⁷.

1.3.2 Alterações cromossómicas estruturais

As alterações cromossómicas estruturais resultam em rearranjos dos cromossomas como consequência de uma ou mais quebras cromossómicas². Estes rearranjos podem ser equilibrados ou não equilibrados. Nos rearranjos equilibrados toda a informação genética é conservada, havendo apenas um acondicionamento diferente da mesma. Nos rearranjos não equilibrados há perda ou ganho de material cromossómico, o que resulta comumente num fenótipo anormal. As quebras cromossómicas são potencialmente letais e podem ser espontâneas ou causadas por agentes químicos ou físicos. Durante o ciclo celular, existem mecanismos de reparação que corrigem as quebras unindo novamente os pontos de quebra e reestabelecendo a integridade do DNA⁵. No entanto, quando não há reparação, ocorrem as chamadas anomalias estruturais, cuja expressão fenotípica é muito variável mas associa-se normalmente a atrasos no desenvolvimento e défice cognitivo⁶. Nos indivíduos normais portadores de rearranjos equilibrados, existe o risco de virem a ter descendência anormal, pelo que é muito importante o

estudo familiar para que se possa detetar se existem outros membros da família portadores da mesma anomalia. Existem vários tipos de alterações cromossomas estruturais: deleções, inserções, duplicações, inversões, translocações, cromossoma em anel e isocromossomas^{2,5}.

As deleções são alterações não equilibradas que resultam da perda de um segmento cromossómico acêntrico². Consoante o local de rutura, as deleções dão designadas terminais, quando existe apenas um ponto de quebra, ou intersticiais, quando ocorrem dois pontos de quebra e se perde o fragmento cromossómico. As deleções provocam monossomias parciais que resultam normalmente em patologias graves. Um exemplo de uma síndrome causada por uma deleção é a síndrome Cri-du-chat. Existem também síndromes causadas por microdeleções, não visíveis ao microscópio ótico, como é o caso da síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Angelman⁶.

As inserções tem origem normalmente numa deleção intersticial num cromossoma, cujo fragmento deletado se insere no local onde ocorreu uma quebra em outro cromossoma. Podem ser diretas se o fragmento de inserir no outro cromossoma mantendo a sua orientação original ou invertidas nos casos em que o fragmento se insere com uma orientação inversa à sua orientação original¹.

As duplicações são alterações não equilibradas que resultam da presença de uma cópia extra de um fragmento do mesmo cromossoma. O efeito fenotípico deste tipo de alteração é geralmente menos grave do que o das deleções, dependendo sempre da extensão do material cromossómico envolvido^{2,5}.

As inversões são anomalias intracromossomais que resultam de duas quebras no cromossoma, cujo fragmento resultante das mesmas sofre uma rotação de 180º e é reinserido no cromossoma com uma orientação inversa à orientação original. As inversões são denominadas de pericêntricas quando o centrómero se encontra dentro da região invertida ou paracêntricas quando os dois pontos de quebra se localizam no mesmo braço cromossómico. Estas alterações são raras e são normalmente equilibradas, ou seja, não existe perda ou ganho de material genético, pelo que não conduzem geralmente a um fenótipo anormal⁶.

As translocações resultam da troca ou recombinação de cromossomas e fazem parte das alterações cromossómicas mais frequentes. Podem ser equilibradas ou não equilibradas e distinguem-se em três tipos: recíprocas, robertsonianas e insercionais⁵. As translocações recíprocas são aquelas em que há uma troca mútua de segmentos entre cromossomas o que resulta num rearranjo equilibrado. Nas translocações robertsonianas, ocorre em dois cromossomas uma quebra no centrómero ou muito próxima deste⁵. Os fragmentos acêntricos resultantes perdem-se e os braços longos dos dois cromossomas que sofreram a quebra fundem-se originando um novo cromossoma. No caso das translocações insercionais, estas acontecem quando um fragmento cromossómico muda de local dentro do mesmo cromossoma ou entre diferentes cromossomas².

Os cromossomas em anel são uma alteração que resulta na formação de um cromossoma com forma circular, causada por quebras nas extremidades de ambos os braços do cromossoma e posterior

fusão dos dois pontos de quebra. O cromossoma em anel origina monossomias parciais quando substitui o homólogo normal no cariótipo e resulta em trissomias parciais quando está presente como cromossoma supranumerário¹.

Os isocromossomas são cromossomas que possuem dois braços com a mesma constituição unidos por um centrómero. A principal causa na origem dos isocromossomas é um erro na divisão celular em que o centrómero se divide transversalmente separando os braços curtos dos braços longos em vez de separar os dois cromatídeos⁵. Alguns isocromossomas são letais como o caso dos isocromossomas dos autossomas não acrocêntricos, mas alguns são compatíveis com a vida, como é o caso do isocromossoma X^{1,2}.

1.4. Conceito de Rastreio Pré-Natal

A vigilância pré-natal tem ao longo do tempo permitido diminuir drasticamente a morbilidade e mortalidade maternas, fetais e infantis. A qualidade desta vigilância tem vindo a aumentar, em Portugal, desde a introdução em 2015, de um programa nacional de vigilância da gravidez¹³. Os principais objetivos do atual programa são detetar precocemente qualquer situação anormal no curso da gravidez e identificar fatores de risco que possam vir a afetar a sua evolução. Assim, uma das etapas essenciais consiste no rastreio pré-natal de anomalias congénitas¹³.

De acordo com a Direção Geral de Saúde (DGS), um teste de rastreio deve cumprir determinados requisitos quanto às características do exame, às características da doença e da possível intervenção a ser feita. No que concerne às características do exame, este deverá ser económico, fiável, reprodutível e não invasivo; no que diz respeito à doença, deve ser avaliada a gravidade, a história natural, se é passível de tratamento, e a sua prevalência, e por fim, a intervenção a realizar (diagnóstico e tratamento) deverá ser eficaz, disponível e acessível¹³. Além de todas estas características, um bom método de rastreio deverá ter elevada sensibilidade e uma baixa taxa de falsos positivos¹⁴. O rastreio pré-natal visa fornecer informação importante acerca da saúde fetal, sobretudo para que os pais possam decidir pela continuidade da gestação ou pela interrupção voluntária da gravidez (IVG). Até 1984, a IVG era proibida em Portugal, passando a ser permitida apenas em casos de malformação fetal, casos em que existisse perigo de vida ou de lesão grave para a saúde da mulher ou ainda em casos em que a gravidez resultasse de uma violação. Em 2007, passou a ser permitida a IVG por opção da mulher até às primeiras dez semanas de gravidez, sendo que em caso de existir malformação ou doença grave no feto este prazo é alargado até às 24 semanas¹⁵. Por este motivo, há cada vez mais a preocupação constante e procura por métodos de rastreio pré-natal seguros e fiáveis que permitam atempadamente detetar anomalias fetais, para que a mulher possa ter tempo e a oportunidade de decidir pela IVG se assim o entender.

O rastreio pré-natal começou a ser desenvolvido em 1950, com a descoberta da ultrasonografia, que além de ser utilizada por si só para o rastreio de anomalias fetais, através da visualização de alterações estruturais no feto; veio também facilitar a realização de procedimentos invasivos de colheita de produtos fetais como a amniocentese. Nos anos seguintes, o aprimoramento das técnicas de citogenética permitiram a obtenção de culturas viáveis de células do líquido amniótico, abrindo portas à análise do cariótipo fetal, tendo os primeiros cariótipos fetais sido obtidos entre 1965 e 1967. O primeiro diagnóstico pré-natal de uma anomalia cromossômica, mais concretamente de trissomia 21, foi descrito por Valenti e Nadler, em 1968. Anos mais tarde, em 1984, vários estudos estabeleceram a relação entre níveis baixos de alfa feto proteína no sangue materno e a presença de trissomia 21 no feto¹⁶. Esta descoberta impulsionou a procura por outros potenciais marcadores bioquímicos que pudessem estar associados a anomalias fetais.

Um estudo de *Bogart et al.* conseguiu estabelecer a relação entre níveis séricos elevados de gonadotrofina coriônica humana na mãe e aneuploidia fetal¹⁶. Outros estudos permitiram associar o estradiol não conjugado, a proteína plasmática associada à gravidez e a inibina A, ao leque de biomarcadores importantes para o rastreio pré-natal de anomalias no feto. Nos anos 90 foram descritos marcadores ecográficos, sendo que a translucência da nuca (TN) foi o que demonstrou ter maior relação com alterações cromossômicas no feto. A TN consiste no espaço preenchido por linfa entre a pele e o tecido subcutâneo que circundam a coluna cervical. A etiologia subjacente ao aumento da espessura da TN é variada, estando associada a defeitos cardiovasculares e pulmonares, displasias esqueléticas, infeções e distúrbios metabólicos e hematológicos. Existe uma forte correlação entre o aumento da espessura da TN e a presença de anomalias cromossômicas, nomeadamente trissomias¹⁷. Assim, após estes desenvolvimentos, foi proposto em 1997 a utilização conjunta da TN e dos marcadores bioquímicos como um rastreio combinado único a ser realizado no primeiro trimestre de gravidez¹⁶.

Atualmente, o rastreio pré-natal tem como objetivo avaliar se existe um risco aumentado do embrião ou feto ter uma anomalia congénita¹⁸. No entanto, os testes de rastreio não são diagnósticos, pelo que independentemente deste ser positivo ou negativo, as gestantes deverão ser devidamente esclarecidas quanto ao significado do resultado e aconselhadas quanto às opções que poderão tomar. As gestantes com rastreio positivo deverão ter oportunidade de realizar um teste diagnóstico, e este deverá ser indicado. As gestantes com rastreio negativo, embora não se possa excluir por completo a presença de uma anomalia congénita, o risco é considerado menor pelo que não deverão ser indicados outros testes invasivos, pois estão associados ao risco de perda fetal. As anomalias congénitas mais frequentes são as aneuploidias, e como tal, estas são o principal alvo de um rastreio pré-natal^{13,17}.

1.4.1 Tipos de rastreio e marcadores bioquímicos no soro materno

O rastreio pré-natal de anomalias fetais em Portugal, baseia-se atualmente na medida da translucência da nuca (TN) por ecografia e na análise de biomarcadores no soro materno tais como: a fração β da gonadotrofina coriónica humana (β -HCG), a proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A), a alfa-fetoproteína (AFP), a inibina A e o estriol não conjugado (uE3)¹⁶. Estes biomarcadores são fetoplacentários, isto é, são produzidos pelo feto ou pela placenta e libertados para a circulação sanguínea materna, e o seu doseamento fornece informação importante acerca do bem-estar fetal¹⁸.

Atualmente existem várias opções de rastreio, que combinam diferentes testes a serem realizados em diferentes momentos da gravidez¹⁸. O rastreio mais comumente utilizado é o rastreio combinado do primeiro trimestre (RCPT), que é realizado entre as 10 semanas e as 13 semanas. O RCPT inclui a medição ecográfica da TN e o doseamento de dois marcadores no soro materno: β -HCG e a PAPP-A. A análise conjunta do resultado destes testes com outros dados maternos como a idade, peso, raça, antecedentes de aneuploidia e número de gestações anteriores, permite calcular a estimativa de risco. Posto isto, o RCPT tem a vantagem de fornecer uma estimativa de risco numa idade gestacional precoce. No segundo trimestre pode ser realizado o rastreio quádruplo do segundo trimestre, que como o próprio nome indica, consiste na medição de quatro marcadores séricos maternos: a β -HCG, a alfa-fetoproteína (AFP), a inibina A e o estriol não conjugado (uE3). Este rastreio realiza-se entre as 15 e as 22 semanas e permite avaliar não só o risco de aneuploidias como também o risco da ocorrência de defeitos do tubo neural. No entanto, tendo em conta que este rastreio é efetuado numa fase mais tardia da gravidez, se o resultado for positivo, as possíveis opções de diagnóstico e intervenções são mais limitadas^{19,20}.

No sentido de obter as vantagens de ambos os métodos, surge o rastreio combinado, que consiste na combinação dos rastreios do primeiro e segundo trimestres, segundo dois modelos: integrado ou sequencial. No modelo integrado, a gestante realiza o RCPT e posteriormente o rastreio quádruplo do segundo trimestre, sendo que os resultados do primeiro rastreio são retidos até à conclusão do segundo rastreio, sendo depois ambos os resultados combinados, dando origem a um único resultado que é traduzido numa estimativa de risco total para aneuploidias fetais. Este método apresenta uma elevada taxa de deteção, de cerca de 96%¹⁸. Contudo, o facto de o resultado final ser disponibilizado tardiamente, limita o tempo e as ações a tomar subsequentemente. Além disto, por vezes a grávida não realiza o segundo rastreio, inviabilizando a eficácia deste modelo. Quanto ao modelo sequencial, são igualmente realizados os rastreios do primeiro e segundo trimestres, porém em vez de se obter apenas um resultado final, obtém-se primeiramente o resultado do primeiro rastreio. Após este primeiro resultado, podem ser seguidas duas diferentes abordagens. Na abordagem passo a passo, caso o RCPT seja positivo, o processo é interrompido e são aconselhados testes de diagnóstico invasivos. Caso o RCPT seja negativo, a gestante prossegue normalmente para o segundo rastreio. Na abordagem contingente, de acordo com o resultado do primeiro rastreio, as gestantes são classificadas como sendo de baixo, intermédio e alto risco. As gestantes de baixo risco não realizam mais qualquer teste sendo que as de risco intermédio

prosseguem para o segundo rastreio e às gestantes de alto risco, é sugerido um teste diagnóstico. A abordagem sequencial evita a realização do segundo rastreio em 75%–80% das mulheres e tem uma taxa de deteção de 89–91%¹⁸. Pelo exposto, conclui-se que o rastreio integrado é o que oferece uma maior taxa de deteção, e o rastreio quádruplo do segundo trimestre é o que oferece uma taxa menor, porém, a escolha do método de rastreio terá de ter em conta outros fatores tais como a idade gestacional, que podem limitar a escolha do mesmo. A tabela 2 engloba as principais características de cada método de rastreio pré-natal.

Tabela 2 – Características dos métodos de rastreio pré-natal. Adaptada de (18)

Tipo de rastreio	Trimestre	Marcadores	Taxa de deteção
Rastreio Ecográfico	1º	Translucência da nuca (TN)	76%
Rastreio quádruplo	2º	β -HCG + AFP + E3+ Inibina A	81%
Rastreio combinado	1º	TN + PAPP-A + β -HCG	85–93%
Rastreio integrado	1º + 2º	TN + Rastreio Combinado + Rastreio Quádruplo	90–96%
Rastreio sequencial por passos	1º + 2º	TN + Rastreio Combinado + Rastreio Quádruplo	87–95%
Rastreio sequencial contingente	1º + 2º	TN + Rastreio Combinado + Rastreio Quádruplo	89–91%

Após um rastreio positivo, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) aconselha à realização de um teste diagnóstico, que permita identificar com clareza qual a anomalia cromossómica presente²⁰. De entre estes, os métodos de diagnóstico pré-natal convencionais são: a amniocentese, a cordocentese e a biópsia das vilosidades coriónicas. Todos estes testes se baseiam na recolha de material fetal para análise genética. Contudo, todos estes testes são invasivos, acarretando risco de perda fetal que, embora mínimo, leva a várias mulheres a optarem por não realizar qualquer um destes procedimentos²¹. A descoberta de DNA fetal livre em circulação no sangue materno, levou ao desenvolvimento de um novo método de rastreio de anomalias congénitas, designado de teste pré-natal não invasivo (NIPT)²². Este teste foi introduzido em 2010 e tem sido aprimorado desde então. O NIPT é realizado a partir de uma amostra de sangue materno, não acarretando risco de perda fetal, o que faz com que seja cada vez mais utilizado. Porém, a utilização deste método para outros fins, como a determinação de características do feto não relevantes para a saúde, tem levantado questões quanto à sua aplicação. A questão de o NIPT dever ou não ser oferecido a todas as mulheres como método de diagnóstico ou de

rastreio, são questões que não reúnem consenso, e que fazem com que não exista ainda uma implementação padronizada deste método²².

1.5. Métodos de diagnóstico pré-natal invasivos

O diagnóstico pré-natal (DPN) permite através de diferentes técnicas e exames, detetar com exatidão se um feto é ou não portador de uma anomalia cromossómica, permitindo confirmar ou contrariar a suspeita levantada pelo rastreio pré-natal. O DPN é muito útil, pois permite reduzir a ansiedade da gestante, prever complicações na gravidez e/ou no parto e principalmente, permite aos pais decidir pela continuidade ou interrupção da gravidez no caso de um diagnóstico positivo²³. Além disto, o facto do DPN permitir diagnosticar a condição do feto, possibilita que se forneça aos pais o acompanhamento psicológico e preparação necessária. Em alguns casos, é possível realizar o tratamento pré-natal da criança afetada²³.

A DGS recomenda que o DPN para aneuploidias seja disponibilizado às grávidas com mais de 35 anos de idade, pois é a idade a partir da qual o risco de se encontrar uma anomalia fetal é maior, considerando-se assim que o benefício da gestante realizar um DPN nesta fase sobrepõe-se ao risco inerente aos procedimentos invasivos do método²⁴.

Para além da idade materna superior a 35 anos, as indicações mais comuns para a realização de um teste de diagnóstico invasivo são anomalias ecográficas, história familiar de anomalias cromossómicas e rastreio bioquímico positivo^{25,26}.

Os métodos de diagnóstico pré-natal são atualmente vários, e sofreram uma grande evolução ao longo do tempo. Inicialmente, estes métodos acarretavam um grande risco de perda fetal, uma vez que não existiam critérios seguros para efetuar a colheita das amostras. Os principais avanços ocorreram na década de 80, aquando da introdução da ultrassonografia, que aumentou significativamente a segurança dos métodos de recolha de material fetal, viabilizando assim a implementação do diagnóstico pré-natal¹⁸. Em 1984, foi publicada legislação que permite a interrupção voluntária da gravidez (IVG), e é a partir desta data que se começa a desenvolver o DPN em Portugal²³. Para tal, foram desenvolvidos procedimentos invasivos com o objetivo de obter células fetais, tais como, a amniocentese, a cordocentese e a biópsia das vilosidades coriónicas²⁵. Estes procedimentos invasivos convencionais, são ainda amplamente utilizados nos dias de hoje.

1.5.1 Amniocentese

A amniocentese é o método de recolha mais antigo utilizado para o DPN. Esta técnica realiza-se entre as 15 e as 18 semanas de gestação, e consiste na realização de uma punção transabdominal guiada por ecografia até à cavidade amniótica, permitindo obter líquido amniótico²⁶. Deste líquido amniótico são isoladas células fetais que são cultivadas, podendo posteriormente ser utilizadas para estudos microbiológicos, genéticos, moleculares e bioquímicos (Figura 6). Este procedimento é o mais comumente utilizado para o diagnóstico de anomalias cromossómicas fetais, podendo também ser utilizado para o diagnóstico de doenças do tubo neural e de infeção do líquido amniótico ou do feto. Em alguns casos, pode ainda ser utilizado como procedimento terapêutico para a remoção do excesso de líquido amniótico, ou para a introdução do mesmo, quando o nível deste é inferior a 200mL²⁶.

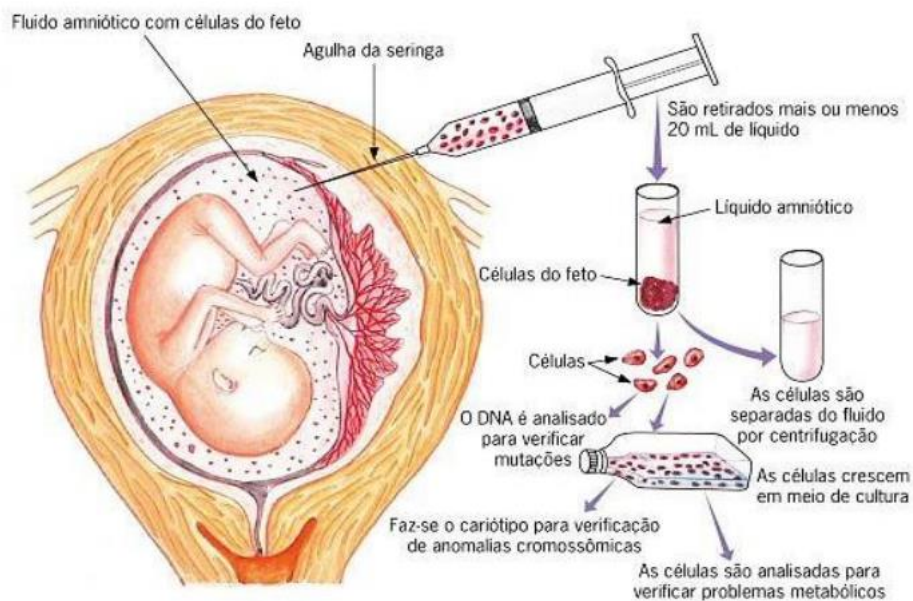


Figura 6 – Ilustração do procedimento amniocentese.

[Fonte:<http://maeos37.blogspot.com/2011/06/amniocentese.html>, acedido em 15/08/2021].

A taxa de risco de perda fetal associada à amniocentese é atualmente muito baixa, sendo inferior a 1%. No entanto, este procedimento poderá acarretar outras complicações, embora raras, tais como: hemorragia vaginal, perda de líquido amniótico, corioamniotite, infeção e lesão fetal. Apesar disto, este método é considerado o *gold standard*, uma vez que apresenta uma elevada taxa de sensibilidade e especificidade e uma taxa de erro mínima, sendo as complicações associadas muito raras¹⁸.

1.5.2 Cordocentese

A cordocentese é um procedimento que permite a recolha de sangue fetal através de uma punção do cordão umbilical. Esta técnica é guiada por ecografia, e é indicado a partir das 18 semanas de gestação. A taxa de perda fetal associada é superior à da amniocentese, sendo entre 1-2%, pelo que este método apenas é utilizado em casos selecionados como por exemplo para a avaliação de mosaicismo cromossómico previamente identificado por amniocentese. Outros riscos associados incluem o sangramento do cordão umbilical, bradicardia fetal e infeção vertical²⁶. Contudo, esta técnica apresenta como vantagem a obtenção cariótipo em 24-48 horas, enquanto as restantes necessitam de 7 a 10 dias devido à necessidade de cultura celular. Assim, este procedimento é muitas vezes utilizado quando a idade gestacional é avançada^{25,26}.

1.5.3 Biópsia das vilosidades coriónicas

A biópsia das vilosidades coriónicas (BVC), foi considerada um avanço na obstetrícia, no início da década de 80, passando a ser utilizada como método no diagnóstico pré-natal. Esta técnica pode realizar-se entre as 10 e as 14 semanas de gestação, e consiste na obtenção de uma amostra placentária por via transabdominal ou transcervical, ambas guiadas por ecografia¹⁸.

A BVC apresenta a vantagem de poder ser realizada numa fase precoce da gravidez, permitindo reduzir o período de ansiedade dos pais e, caso seja necessário, de efetuar uma IVG mais precoce e segura. No entanto, a taxa de erro associada à BVC é superior à da amniocentese, e atribui-se normalmente ao mosaicismo confinado à placenta²⁰. A taxa de perda fetal é inferior a 2% e raramente surgem outras complicações tais como sangramento vaginal, perda de líquido amniótico e infeção²⁵.

1.6. Citogenética convencional

A citogenética convencional consiste na análise dos cromossomas de acordo com o seu tamanho, posição do centrómero e padrão característico de bandas. Esta análise exige células em divisão celular ativa que podem ser provenientes de diversos tecidos, nomeadamente células do sangue periférico, células do líquido amniótico e células de biópsias de tecidos. Amostras de sangue periférico são as mais utilizadas para a realização de estudos pós-natais sendo as amostras de líquido amniótico as mais utilizadas para a realização de estudos pré-natais. Após a obtenção da amostra, o estudo citogenético compreende várias fases: a cultura celular, a manipulação, o espalhamento, a bandagem e por fim a análise ao microscópio²⁷.

1.6.1. Cultura celular

Para se obterem células em divisão celular, estas são colocadas em meio de cultura apropriado. Os meios de cultura utilizados são geralmente meios aquosos com uma mistura de sais e glicose, podendo também conter outros aditivos como vitaminas, aminoácidos, fatores de crescimento, antibióticos e fungicidas de modo a garantir todas as condições ideais ao crescimento e divisão celular. A escolha do método de cultura é normalmente feita de acordo com o tipo de amostra. Normalmente para amostras de sangue periférico são realizadas culturas em suspensão enquanto para amostras de tecidos e líquidos amnióticos realizam-se culturas em monocamada, feitas em caixas de cultura, uma vez que este tipo de células têm a necessidade de se fixar a uma superfície para crescerem. Após colocadas em cultura, é necessário manter as condições ótimas de temperatura, humidade e pH para que se obtenha um número suficiente de células. O tempo de cultura varia com o tipo de células, sendo o tempo de cultura para as células de sangue periférico entre 72 a 96 horas, muito inferior ao tempo de cultura das células do líquido amniótico e amostras de tecidos, que pode ser até duas semanas².

1.6.2. Manipulação celular

Após se obter um número suficiente de células em divisão celular, segue-se a fase da manipulação que consiste em várias etapas. A primeira etapa consiste em interromper o ciclo celular em metáfase utilizando para tal um inibidor mitótico, sendo o mais usado nos laboratórios o colcemide. A segunda etapa consiste em provocar um choque hipotónico, através da adição de uma solução hipotónica que vai promover a turgescência das células, sendo este passo essencial para que ocorrer espalhamento dos cromossomas na lâmina. De seguida é realizada a fixação celular com uma solução de metanol e ácido acético, que vai parar a ação da solução hipotónica. A última etapa é o espalhamento que consiste em promover a rutura das células, o que vai permitir espalhar os cromossomas na lâmina. Estes deverão ficar espalhados de forma a que não fiquem demasiado dispersos na lâmina, nem demasiado sobrepostos, para que se obtenha uma boa visualização dos mesmos. Assim, as condições de humidade e temperatura devem ser as ideais bem como o ângulo e altura de espalhamento. Após o espalhamento as lâminas são normalmente observadas em contraste de fase para avaliar o número de metáfases e a qualidade do espalhamento²⁷.

1.6.3. Coloração e bandagem

Após o espalhamento e a avaliação das lâminas em contraste de fase, é realizada uma técnica de bandagem. As diferentes técnicas de bandagem que existem, permitem distinguir no cromossoma bandas

com coloração mais clara ou mais escura. A distinção de coloração entre as bandas deve-se a fatores como a composição de bases nucleotídicas, ao tempo do ciclo em que ocorre a replicação, à conformação da cromatina e ao número de genes e de sequências repetitivas¹. Após uma técnica de bandagem, cada par de cromossomas apresenta um padrão único que permite distingui-los e agrupá-los¹⁸.

1.6.4. Análise microscópica

Após a bandagem, as lâminas são observadas ao microscópio ótico com o objetivo de identificar células em metáfase. As células encontradas em metáfase com qualidade são analisadas individualmente, contando-se o número de cromossomas. Atualmente existem softwares específicos que permitem captar as imagens das metáfases para posterior organização dos cromossomas e montagem do cariótipo. O objetivo da análise é a detecção de anomalias numéricas e/ou estruturais nos cromossomas²⁷.

Apesar da citogenética convencional ser considerada o método padrão e permitir uma análise muito precisa e completa dos cromossomas, apresenta algumas limitações como por exemplo o baixo poder de automatização (tanto os procedimentos práticos, como a análise dos cromossomas, requerem bastante experiência por parte de técnicos especializados), o tempo para a obtenção de resultados (8 a 14 dias, dependendo do crescimento celular), o risco de insucesso da cultura por contaminação ou inexistência de crescimento celular e um poder de resolução limitado, sendo ainda uma análise sujeita a variabilidade inter-observador²⁷.

Estas limitações tornam-se especialmente problemáticas nos casos em que existe um elevado risco da presença de uma anomalia cromossômica, como por exemplo nos casos em que o rastreio ecográfico e/ou bioquímico foi positivo. Além disso, o tempo para a obtenção de resultados é problemático nos casos em que o tempo de gestação é avançado, encontrando-se próximo do limite para que se possa proceder à IVG.

1.7. Genética molecular

1.7.1. Fluorescence in situ hybridization - FISH

A técnica de FISH consiste na utilização de uma sonda oligonucleotídica marcada com um fluorocromo, complementar a uma sequência do DNA alvo. Posteriormente, o sinal emitido pelo

fluorocromo é visualizado por microscopia de fluorescência, sendo o número de sinais fluorescentes em cada núcleo representa o número de cópias do segmento alvo. Esta técnica é simples, rápida e económica, tendo a vantagem de não ser obrigatório cultivar e isolar as células, como acontece na citogenética convencional^{28,29}. Os principais passos em que esta técnica decorre estão esquematizados na Figura 7.

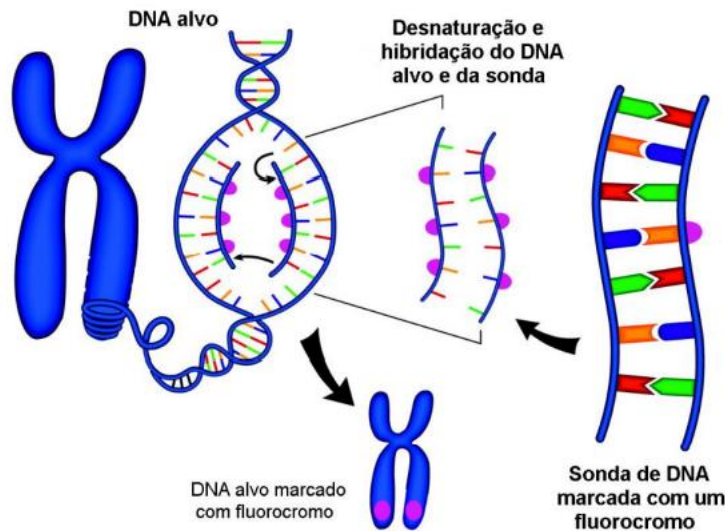


Figura 7 – Etapas da técnica de FISH. Adaptado de (29).

Para efeitos de DPN, a técnica de FISH é utilizada para o rastreio rápido das principais aneuploidias, utilizando-se normalmente para a realização desta metodologia um painel de sondas comerciais para os cromossomas 13, 18, 21, X e Y. Esta metodologia tem a desvantagem de ser necessário haver uma suspeita específica, facto que limita o seu poder de diagnóstico²³.

1.7.2. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction – QF-PCR

A QF-PCR é uma técnica que se baseia na amplificação de sequências de DNA repetitivas e altamente polimórficas que podem variar de comprimento entre indivíduos, denominadas de *short tandem repeats* (STRs). Os STRs são frequentemente utilizados para detetar anomalias cromossómicas específicas, devido à sua variabilidade, estabilidade no tempo de vida de um indivíduo e sua adequação a ensaios multiplex. Assim, após a amplificação, os produtos são separados por eletroforese capilar e analisados recorrendo a um sequenciador automático. A análise dos resultados baseia-se no número de picos de fluorescência e no cálculo da rácio entre esses picos, sendo feita da seguinte forma: para um determinado marcador num determinado loci, amostras de indivíduos normais apresentam dois picos, com uma área na proporção de 1:1. Amostras de indivíduos com trissomia apresentam três picos, com áreas na proporção de 1:1:1 ou dois picos com áreas na proporção de 2:1²⁸.

Esta metodologia requer pouca quantidade de ADN e permite numa única reação de PCR detetar/excluir as aneuploidias mais comuns, existindo atualmente kits comerciais que permitem obter resultados em 24 horas e a custo reduzido. Além disso, permite a deteção de contaminação materna e de triploidias em casos do sexo feminino. Porém, a QF-PCR apenas permite detetar alterações nos cromossomas onde se encontram os STRs utilizados^{27,28}.

1.7.3. Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA

A técnica de MLPA consiste na utilização de duas sondas oligonucleotídicas, complementares a regiões adjacentes na sequência de DNA alvo. Para tal, é utilizado apenas um par de primers, que é idêntico em todas as sondas. Após a hibridação das sondas, estas ligam-se enzimaticamente, através da ação de uma ligase termoestável. Apenas as sondas que são eficientemente ligadas são amplificadas. Todas as restantes que não se ligarem, não são amplificadas, pelo que não há necessidade de remoção dos produtos não ligados. A separação dos fragmentos resultantes é feita por eletroforese capilar num sequenciador automático, de acordo com o seu tamanho e intensidade de fluorescência³⁰. Os resultados são analisados através da leitura dos picos de fluorescência obtidos, e comparação com um padrão de referência. Assim, o aumento ou diminuição da área do pico do produto de amplificação, em relação ao padrão de referência, traduz a existência de um número anormal de cópias³¹. As etapas da técnica de MLPA estão esquematizadas na Figura 8.

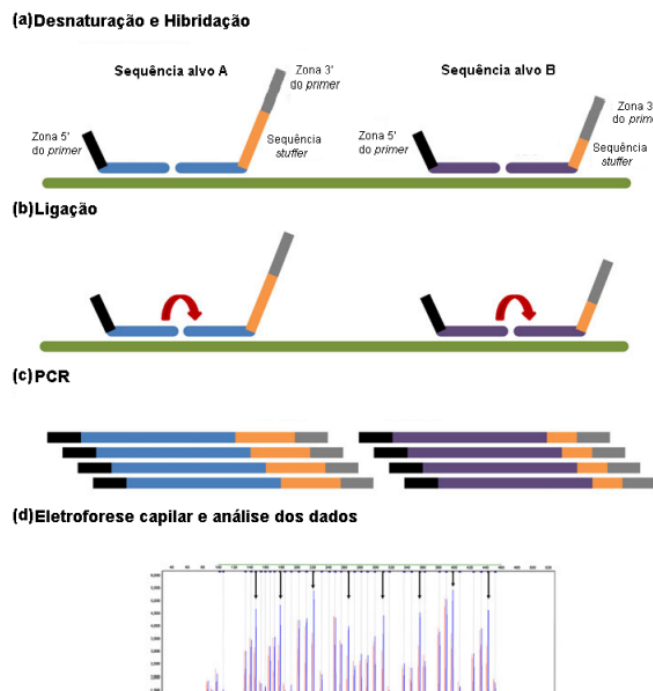


Figura 8 – Representação esquemática das etapas da técnica de MLPA: (a) desnaturação da amostra e hibridação das sondas, (b) ligação enzimática das sondas, (c) amplificação por PCR e (d) separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar. Adaptado de (30)

Esta técnica é fácil de executar, barata e rápida, necessitando apenas de 20 ng de DNA. Permite a análise de diversas sequências numa única reação, e poder ser usada em várias aplicações, exigindo equipamento básico, normalmente disponível num laboratório de biologia molecular. Contudo, não permite a deteção de contaminação materna, nem de anomalias estruturais equilibradas, nem triploidias em casos do sexo feminino³⁰.

1.7.4. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH)

A técnica de aCGH é uma técnica que permite analisar todo o genoma com uma grande resolução, permitindo detetar alterações submicroscópicas no material cromossómico como microdeleções e microduplicações. Baseia-se no princípio da hibridação genómica comparativa e consiste na marcação do DNA genómico do indivíduo e do controlo com fluorocromos distintos, co-hibridizando posteriormente as amostras com um conjunto de fragmentos genómicos dispostos em diferentes spots ao longo de placas de *array*³². O DNA do indivíduo a testar e o DNA controlo vão hibridar competitivamente com as sondas representativas do genoma humano presentes no *array*. Após a hibridação, a intensidade de fluorescência emitida pelos fluorocromos é medida por um *scanner* e analisada por um *software* (Figura 9)³². A análise dos picos de fluorescência permite inferir se em determinada posição genómica houve perda ou ganho de material genético. Relativamente à técnica tradicional de citogenética, a aCGH apresenta a desvantagem de não permitir detetar alterações equilibradas, nem poliploidias ou mosaicismos de baixa expressão. No entanto, permite detetar alterações submicroscópicas não detetadas pela análise do cariótipo nem pela técnica de FISH. Esta técnica é muitas vezes utilizada para diagnóstico em amostras pré e pós-natais, contudo, alterações detetadas por aCGH necessitam geralmente de validação por outras técnicas como MLPA³².

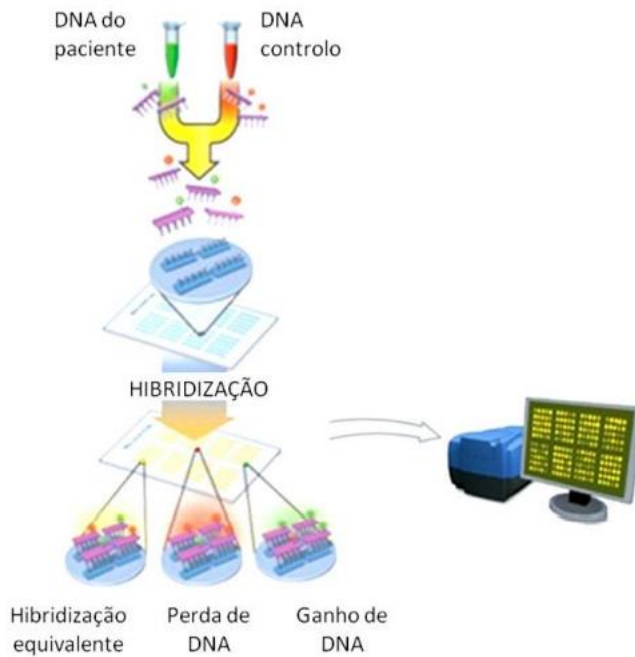


Figura 9 – Esquema das etapas da técnica de aCGH. Adaptado de (32)

1.8. Objetivos

As metodologias convencionais utilizadas para o diagnóstico pré-natal têm a desvantagem de necessitar da recolha direta de material fetal, que só pode ser realizada por meio de procedimentos invasivos, que acarretam o risco de perda fetal. Os métodos de rastreio pré-natal como o rastreio bioquímico no soro materno, embora não sejam invasivos e portanto não acarretem este risco, não são suficientemente sensíveis nem específicos. A descoberta de DNA fetal livre em circulação no plasma materno, veio permitir o desenvolvimento de um teste pré-natal não invasivo que se espera poder ser a solução para estas limitações.

Assim, os objetivos desta revisão consistem em explicar em que consiste o NIPT e quais as metodologias disponíveis atualmente; comparar as vantagens, desvantagens e relação custo-efetividade do NIPT, definir à luz do conhecimento atual qual o impacto real do uso do NIPT no DPN e avaliar as possíveis aplicações futuras no DPN.

2. Métodos

Para a realização deste trabalho de revisão foi feita uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed, utilizando as seguintes palavras chave: "*prenatal diagnosis*", "*maternal serum screening methods*", "*noninvasive prenatal testing, aneuploidy*" e "*cell-free nucleic acids*". De modo a obter apenas o conhecimento mais atualizado, foram pesquisados artigos publicados entre 2017 e junho de 2021. Os resultados desta pesquisa foram analisados tendo sido selecionados apenas os artigos de interesse.

De modo a complementar a informação encontrada, foram também consultadas algumas das referências bibliográficas dos artigos selecionados, bem como algumas guidelines e documentos do American College of Obstetricians and Gynecologists e de algumas instituições portuguesas. A partir desta pesquisa foi elaborada a presente revisão literária acerca do Teste pré-natal não invasivo.

3. Resultados

3.1. Teste pré-natal não invasivo

Nas últimas décadas, tendo em conta as limitações no âmbito dos métodos de rastreio e dos métodos de diagnóstico pré-natal convencionais, a investigação tem sido no sentido de desenvolver métodos mais seguros, que não acarretem risco de aborto e sejam sensíveis e específicos.

Assim, o primeiro passo no desenvolvimento de um teste não invasivo e que permitisse o rastreio do feto foi a identificação e recuperação de células fetais do sangue materno, reportada pela primeira vez em 1969, por Walknowska³³. A descoberta de metáfases com a presença do cromossoma Y, em sangue de mulheres grávidas de fetos do sexo masculino, permitiu comprovar a existência de células fetais em circulação materna³⁴. No entanto, e apesar desta descoberta ter sido um grande avanço, a escassez das células fetais encontradas impulsionou vários estudos focados na identificação e enriquecimento de células fetais na circulação materna e análise das mesmas³³. Estes estudos revelaram a presença de vários tipos de células fetais no sangue materno, incluindo trofoblastos, linfócitos, eritroblastos e plaquetas. Todos estes tipos celulares foram alvo de estudos, exceto as plaquetas por não possuírem DNA.

As investigações seguiram no sentido de se perceber, de entre os diferentes tipos de célula capazes de atravessar a placenta, qual seria o que tem maior potencial para ser utilizado em estudos genéticos. Vários estudos identificaram os eritroblastos como sendo as células com maior potencial, devido à sua elevada concentração no sangue materno, aparecerem num estadio precoce da gravidez, e por serem células não expectáveis de serem encontradas no sangue materno³³. Em 1990, *Bianchi et al.* conseguiu identificar e isolar eritroblastos fetais do sangue materno, e identificar o sexo fetal³⁴. Após este avanço, vários esforços foram realizados no sentido de desenvolver uma metodologia sólida que permitisse detetar, enriquecer e amplificar o material genético fetal presente nestas células, no entanto, o que se conseguiu foi uma metodologia inconsistente, demorada, dispendiosa e com baixo rendimento, que acabou por desmotivar os investigadores^{33,34}.

Em 1997, *Lo et al.* identificaram ADN fetal livre (cffDNA) na circulação materna, o que impulsionou o desenvolvimento de um teste pré-natal não invasivo³⁵.

3.1.1. ADN fetal livre

O DNA livre consiste em pequenos fragmentos de DNA (<200pb) que circulam no plasma materno em consequência do turnover celular fisiológico. Na mulher grávida, parte deste DNA livre é fetal, e pensa-se ter origem na apoptose das células sínciotrofoblásticas e citotrofoblásticas da placenta. Após o parto, o

cffDNA (do inglês *cell free fetal DNA*) é abundante, estável, e rapidamente eliminado da circulação materna após o parto, o que demonstra que é específico do feto da última gestação. Esta descoberta impulsionou o desenvolvimento de uma abordagem não invasiva, utilizando o DNA fetal presente no sangue materno para fins de rastreio e diagnóstico de anomalias fetais³⁶ (figura 10).

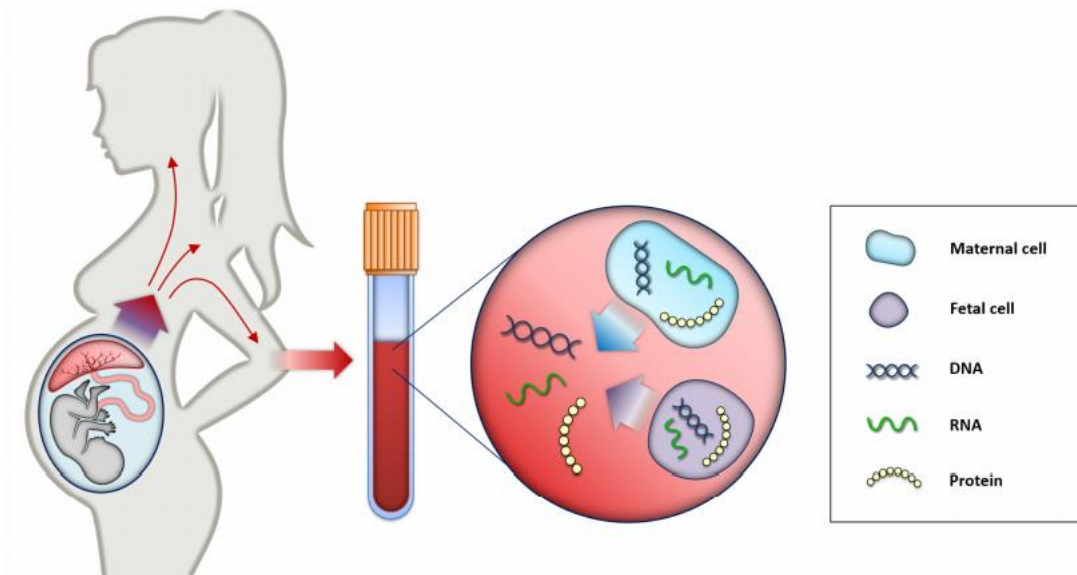


Figura 10- Ilustração de sangue materno com elementos fetais em circulação. Adaptado de (36)

A percentagem de DNA fetal em relação ao DNA total no plasma materno denomina-se por fração fetal (FF). O uso da FF permitiu o desenvolvimento de uma metodologia mais fácil, rápida e produtiva³⁶. Estudos prévios demonstraram que a FF corresponde em média a 10% do DNA livre total no sangue periférico, e vai aumentando com o tempo de gestação, podendo ser detetada a partir das 4 semanas de gestação²². A quantidade de FF obtida influencia a performance do teste. Se a FF for demasiado pequena, a anomalia presente poderá ser camuflada pelo DNA livre materno. Assim, para uma análise confiável é necessária uma FF mínima de 4%, embora este limite possa variar de acordo com a tecnologia e abordagem utilizadas, pelo que atualmente, cada laboratório define o seu valor cut-off²².

Além da idade gestacional, outros fatores influenciam a FF, nomeadamente o peso, o índice de massa corporal, e o volume sanguíneo maternos³⁷. Estes fatores relacionam-se de forma inversa com a FF, isto é, quanto maior o peso, o IMC e o volume sanguíneo da mãe, por norma, menor FF³⁶. Isto acontece devido ao facto do aumento destes três fatores provocar um aumento do *turnover* celular fisiológico, o que faz com que haja mais DNA materno livre em circulação e como consequência menos DNA fetal. Um estudo demonstrou que em determinadas alturas da gestação, a FF tende a ser superior quando o feto é portador de T21 e inferior quando este é portador de T18, ou T13. (figura 11).

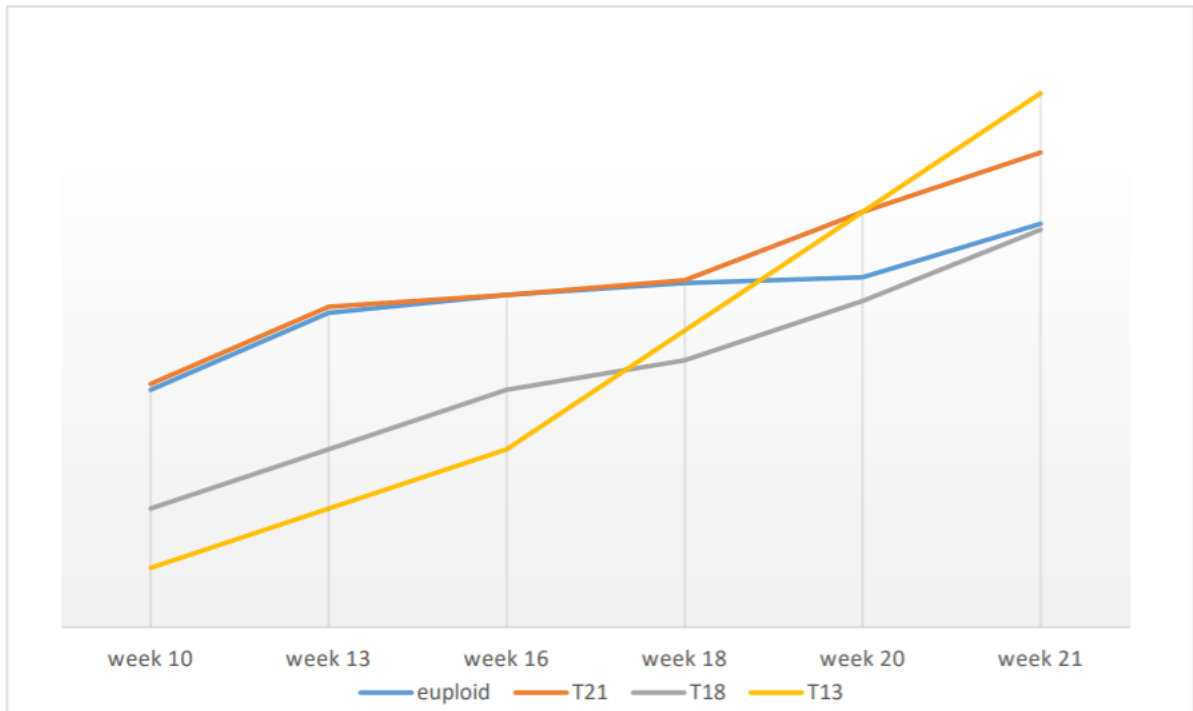


Figura 11 – Variação da fração fetal ao longo da gestação de um feto saudável, com T21, T18 e T13. Adaptado de (37)

A FF pode ser calculada por diferentes métodos tais como métodos baseados no cromossoma Y, métodos de quantificação de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e métodos baseados na metilação diferencial entre o genoma materno e fetal³⁸. Todos estes métodos se baseiam nas diferenças entre o DNA fetal e materno.

Os métodos baseados no cromossoma Y consistem na quantificação de sequências específicas do cromossoma Y³⁸. Seria expectável que o número de fragmentos de DNA correspondentes a sequências do cromossoma Y fosse diretamente proporcional à FF. No entanto, existe uma região designada por região pseudo-autossómica, que é 98% homóloga à região q13–q22 do cromossoma X e corresponde a uma porção significativa do cromossoma Y³⁹. Atendendo a este fator, foram desenvolvidas fórmulas matemáticas que permitem calcular a fração fetal excluindo o contributo da região pseudo-autossómica. Este método é simples e preciso, mas apenas aplicável a gestações de fetos do sexo masculino.

Um outro método baseia-se nas diferenças de metilação do genoma fetal e genoma materno. Os padrões de metilação sofrem alterações ao longo do tempo pelo que é natural que mãe e feto apresentem padrões de metilação diferentes. Atualmente já são conhecidos alguns genes “marcadores” que se sabe estarem diferencialmente metilados na mãe e no feto. Por exemplo, o gene PDE9A é hipermetilado no genoma materno e hipometilado no genoma fetal³⁹. Também o gene SERPIN5B se encontra hipometilado no genoma fetal mas não no genoma materno³⁹. A deteção da presença ou ausência destes genes marcadores é feita recorrendo a enzimas de restrição sensíveis à metilação. Esta estratégia é utilizada no

ensaio de quantidade fetal (FQA), descrito por *Nygren et al.*⁴⁰ Neste ensaio, são utilizadas enzimas de restrição para digerir o DNA materno não metilado, deixando a região genômica hipermetilada intacta, bem como os genes marcadores. A quantificação da fração fetal é feita recorrendo a métodos quantitativos como PCR em tempo real^{39,40}.

Outro método de cálculo da FF é o método de quantificação de SNPs. Os SNPs consistem em sequências alternativas de uma única base em determinada posição do DNA genômico³⁸. A identificação destes polimorfismos pode permitir diferenciar o DNA fetal do DNA materno. Para este efeito, o DNA livre (que contém DNA materno e DNA fetal) é extraído do sangue materno e sequenciado por NGS³⁹. As leituras geradas são alinhadas com um genoma de referência. Numa determinada posição do genoma, o feto irá apresentar um nucleotídeo diferente do da mãe e do genoma de referência, ou seja, uma variante de um único nucleotídeo, ou seja, um SNP. Esta diferença vai permitir distinguir as sequências referentes ao DNA fetal das sequências referentes ao DNA materno. Conhecendo-se o número de sequências pertencentes à mãe e ao feto é possível através de diferentes abordagens com recurso a cálculos matemáticos, estimar a FF⁴⁰.

3.1.2. Tecnologias do NIPT

Atualmente, as principais tecnologias utilizadas para analisar o genoma fetal através do cffDNA são as tecnologias baseadas na sequenciação de nova geração – *Next Generation Sequencing* (NGS).

3.1.2.1 Next Generation Sequencing (NGS)

A sequenciação de ácidos nucleicos constitui uma das bases fundamentais à investigação biológica. O primeiro grande progresso na tecnologia de sequenciação de DNA foi introduzido, em 1977, por *Sanger*, e foi sofrendo melhorias ao longo do tempo⁴¹. Atualmente, a sequenciação clássica de *Sanger* baseia-se em terminações de cadeia específicas de base em quatro reações separadas, correspondentes aos quatro nucleotídeos que compõe o DNA (A, G, C, T). Na presença de todos os quatro desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), um didesoxinucleotídeo trifosfatado (ddNTP) específico acoplado a um fluorocromo é adicionado a cada reação. A extensão de uma cadeia de DNA recentemente sintetizada termina cada vez que um ddNTP correspondente é incorporado. A razão dNTP/ddNTP na reação de sequenciação determina a frequência de terminação da cadeia, e portanto, a distribuição dos comprimentos das cadeias terminadas. A sequência é determinada após ser submetida a uma eletroforese de alta resolução em tubos capilares, onde os produtos são separados segundo o tamanho.

Após a separação, os fragmentos marcados passam pelo detetor, onde um laser excita os fluorocromos, produzindo emissões de fluorescência de quatro cores diferentes. A fluorescência emitida é lida num software especializado que permite assim conhecer a sequência de DNA⁴².

A facilidade e precisão do método de *Sanger*, levaram a que fosse a tecnologia de sequenciação de DNA mais utilizada ao longo de 30 anos. No entanto, e apesar da sua automatização, o método de *Sanger* era ainda considerado caro e ineficiente para processos de sequenciação em larga escala. Assim, no sentido de tornar o processo de sequenciação mais célere e económico surgiram os métodos de sequenciação de nova geração. Estes métodos apresentam como principais diferenças comparativamente ao método de *Sanger* o facto de permitirem gerar milhões de seqüências curtas em paralelo, e não necessitarem de eletroforese, sendo simultaneamente mais rápidos e apresentando menor custo. Apesar de diferentes entre si, as plataformas de nova geração têm em comum o facto de se basearem na sequenciação paralela massiva de fragmentos de DNA.

As primeiras tecnologias de sequenciação de nova geração a surgir foram denominadas de tecnologias de sequenciação de segunda geração. O primeiro grande sucesso de sequenciação de segunda geração foi o sistema de pirosequenciação GS20, introduzido em 2005 pela *454 Life Sciences*, em *Branford, Connecticut*³⁹. Anos mais tarde, esta empresa foi adquirida pela Roche³⁹. Esta metodologia baseia-se no princípio de sequenciação por síntese e provou ser 100 vezes mais rápida do que a sequenciação convencional pelo método de *Sanger*, e com menor custo⁴². A técnica utilizada consiste em três etapas: preparação da amostra, reação de PCR em emulsão e por fim a sequenciação. Na preparação da amostra, o DNA é fragmentado por nebulização e posteriormente os fragmentos obtidos ligam-se a adaptadores específicos que vão estabelecer a ponte de ligação entre os fragmentos e microesferas magnéticas sintéticas denominadas "*beads*". A segunda etapa consiste na reação de PCR em emulsão, em que são realizadas PCRs em gotículas aquosas separadas por uma fase oleosa, que vão funcionar como micro reatores. Cada *bead* com um único fragmento genómico é individualmente incorporada em cada gotícula oleosa, juntamente com reagentes de PCR. A amplificação permite obter múltiplas cópias de cada fragmento por *bead*. Por fim na etapa de sequenciação, as microesferas são distribuídas numa placa com poços de maneira a que cada poço fique apenas com uma microesfera. De seguida são adicionados todos os reagentes necessários para a reação de sequenciação. As bases são depois adicionadas sequencialmente à placa, sendo que a incorporação de cada base na cadeia em síntese vai libertar um grupo pirofosfato, que vai desencadear uma reação química catalisada enzimaticamente que por sua vez originará a emissão de luz. Assim sendo, ao conhecer a identidade do nucleótido adicionado, é possível saber qual a sequência de bases da cadeia em síntese, através do sinal de luz emitido⁴¹. Todas estas etapas se encontram esquematizadas na Figura 12.

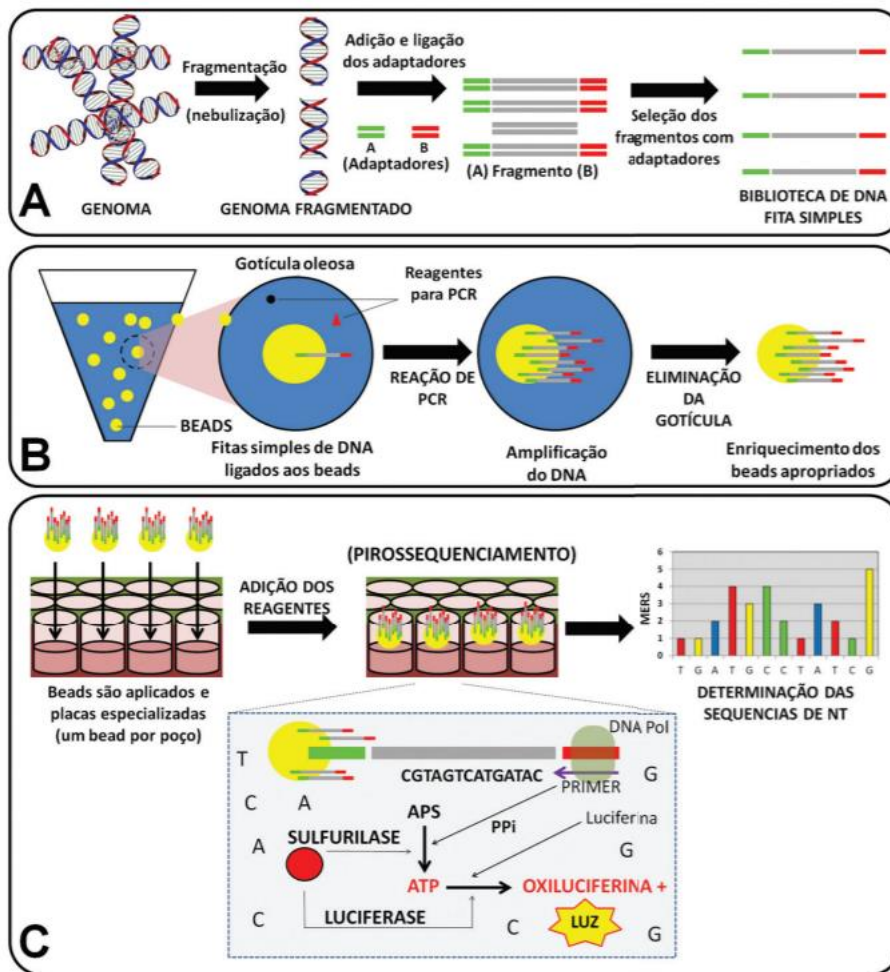


Figura 12 – Esquema do processo de sequenciação do sistema GS20 454. Adaptado de (39)

No mesmo ano em que surgiu o sistema de pirosequenciação GS20, surge também o sistema Solid™, desenvolvido pela empresa *Applied Biosystems* sediada em *Waltham, Massachusetts*. Para a construção da biblioteca desta plataforma, os fragmentos de DNA são ligados a adaptadores universais, sendo depois acoplados às *beads* através da ligação de um dos adaptadores a uma sequência curta complementar presente na superfície da *bead*⁴³. A uma determinada *bead* apenas se vai ligar um tipo de fragmento. Posteriormente, as *beads* são “capturadas” em gotículas onde ocorre a reação de PCR em emulsão. Como resultado são produzidas milhares de cópias do mesmo fragmento. A etapa de sequenciação desta plataforma difere de outras metodologias por utilizar uma DNA ligase em substituição de uma DNA polimerase. A sequenciação ocorre através da ligação de sondas fluorescentes, cada uma contendo oito nucleotídeos: os primeiros dois nucleotídeos são informativos, os três seguintes podem ser qualquer um dos quatro tipos de nucleotídeos (organizados aleatoriamente em todas as combinações possíveis), e os

semelhança da sequenciação de Sanger, nucleótidos terminadores acoplados com um fluorocromo diferente para cada uma das quatro bases. O processo inicia-se com a fragmentação do DNA de interesse, através de processos de sonicação, nebulização, ou também por métodos químicos e enzimáticos. No final, os fragmentos de DNA resultantes devem possuir um nucleotídeo com um grupo fosfato livre que vai permitir a ligação dos adaptadores específicos. Através da complementaridade destes adaptadores, os fragmentos a serem sequenciados ligam-se a pequenos *primers* que se encontram imobilizados numa célula de fluxo. De seguida, ocorre a amplificação em ponte, que resulta na formação de *clusters* de sequências de DNA, utilizando diversos *primers* adjacentes aos fragmentos imobilizados. Este processo resulta num fragmento de DNA de cadeia dupla que é posteriormente desnaturado, podendo ligar-se novamente a outros *primers* adjacentes, também imobilizados na célula de fluxo, para um novo ciclo de amplificação. Após a geração destes *clusters* densos de sequências idênticas, a sequência “*antisense*” de cada cadeia de DNA molde é clivada e o adaptador complementar é bloqueado, de forma a que apenas as cadeias “*sense*” permaneçam na célula de fluxo. Posteriormente é realizada a sequenciação com recurso a uma DNA polimerase que vai incorporar, nas cadeias recém sintetizadas, nucleotídeos terminadores com fluorescência e reversivelmente bloqueados na extremidade 3'. De cada vez que um nucleotídeo é incorporado, o sinal de fluorescência específico de cada *cluster* é detetado pelo equipamento e o bloqueador na extremidade 3' do nucleotídeo terminador é removido, para que o próximo nucleotídeo possa ser incorporado.

A tecnologia de sequenciação da Illumina é a mais amplamente utilizada em todo o mundo. Atualmente, a empresa comercializa seis diferentes equipamentos que permitem diferentes aplicações de acordo com o que é pretendido pelo consumidor. Os equipamentos iSeq100, MiniSeq e MiSeq Series são considerados “sequenciadores de bancada” por serem de tamanho pequeno e por gerarem uma menor quantidade de leituras por corrida. Já os equipamentos NextSeq555 Series, NextSeq 1000 & 2000 e o NovaSeq6000 são sequenciadores de larga escala, que permitem obter milhões de leituras por corrida num curto espaço de tempo.

Em 2010 surge a metodologia *IonTorrent* comercializada pela *Life Technologies* que converte diretamente a sequência de nucleotídeos em informações digitais, num chip semiconductor⁴². O princípio desta tecnologia baseia-se na deteção de diferentes picos de voltagem de cada vez que um nucleotídeo é incorporado. Nesta tecnologia a amplificação é também feita por PCR de emulsão, mas as *beads* são colocadas num chip iónico de silício semiconductor, que consiste num sequenciador acoplado a um sensor iónico que deteta variações de pH dentro dos poços individuais onde ocorre a reação. Na reação de síntese de DNA, sempre que cada nucleotídeo é incorporado na cadeia recém-sintetizada, ocorre a libertação de um protão H⁺, o que origina uma alteração no pH que é detetada como uma variação de voltagem pelo detetor de silício. Assim, cada evento de incorporação é traduzido por um pico de voltagem, sendo que os

nucleotídeos não têm nada que os identifique pelo que têm de ser adicionados por uma sequência definida^{41,42}.

Apesar de representarem um enorme avanço, os sequenciadores de segunda geração apresentaram algumas limitações tais como a ocorrência de erros na formação das bibliotecas genómicas, a amplificação preferencial de certos fragmentos da biblioteca, entre outras. Estas limitações conduziram à necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias, designadas de tecnologias de terceira geração, onde não há necessidade de amplificação, sendo a sequenciação feita em moléculas únicas. Esta inovação permitiu aumentar a rapidez, rendimento e sensibilidade do processo, a um baixo custo e com pequenas quantidades de amostra.

O primeiro sistema de sequenciação de terceira geração introduzido foi o *Helicos*, desenvolvido pela empresa agora denominada por *Helicos Biosciences*, que se situa em *Cambridge, Massachusetts*. Neste sistema, os fragmentos de DNA a analisar são hibridados com os *primers* e fixados numa placa de vidro, numa célula de fluxo, em posições pré-definidas. Os reagentes necessários à sequenciação são então adicionados à placa de vidro. Cada base adicionada à cadeia em síntese é determinada pela fluorescência emitida⁴².

Outro sistema de terceira geração é da *Pacific Biosciences*, sediada em *Menlo Park, California*, e que utiliza uma tecnologia de sequenciação chamada *Single Molecule Real Time (SMRT)*, que como o próprio nome indica, se baseia na sequenciação em tempo real de uma única molécula. Esta sequenciação é conseguida através da utilização de *Zero-Mode Waveguides (ZMW)* para detetar a incorporação de nucleótidos numa cadeia em formação. Assim, a reação de sequenciação é realizada por uma DNA polimerase ligada covalentemente na base de cada ZMW. Durante a sequenciação, o DNA alvo é alongado pela DNA polimerase com nucleótidos terminadores marcados na terminação fosfato com diferentes fluorocromos. O facto de a marcação ser feita no grupo fosfato permite que a enzima clive a fluorescência como parte do processo de incorporação do nucleótido na cadeia nova de DNA. A sequência é determinada através da leitura simultânea e contínua da fluorescência em cada uma das milhares de câmaras ZMW⁴².

A tecnologia mais recente é a *Oxford Nanopore technology*, comercializada pela empresa *Nanopore Sequencing*, sediada em *Oxford* no Reino Unido. Nesta tecnologia é utilizada uma sequenciação por nanoporos, sendo apontada como potencial tecnologia de quarta geração. O princípio desta tecnologia baseia-se nas variações de correntes elétricas que resultam da translocação das moléculas de DNA através de nanoporos. Este sistema envolve o uso de uma membrana fina, com elevada resistência elétrica, contendo poros com aproximadamente 1.5 – 2 nm de diâmetro, imersa numa solução salina. Cada nanoporo possui localmente a cadeia de DNA enrolada que permite que os nucleótidos sejam transferidos sequencialmente através do poro. Uma vez que a molécula de translocação bloqueia parcialmente a corrente de iões através do nanoporo, as alterações da corrente são utilizadas para deduzir a sequência

dos nucleótidos da cadeia de ácido nucleicos. Moléculas de diferentes tamanhos vão bloquear o poro de forma diferente, ou durante espaços de tempo diferentes, possibilitando a discriminação entre as quatro bases de DNA e assim a identificação da sequência.

Apesar das mais recentes tecnologias serem bastante promissoras, são ainda escassos os estudos que reportam a sua utilização no NIPT, sendo que neste âmbito, as tecnologias de sequenciação de segunda geração são as que se encontram mais estudadas e validadas até ao momento.

Análise bioinformática do genoma humano

As técnicas de NGS vieram diminuir drasticamente o custo de sequenciação, aumentando em simultâneo o seu rendimento, o que resultou num enorme volume de dados de sequenciação. Este facto veio originar um novo problema: como organizar, gerir e analisar todos os dados? Para solucionar este novo desafio, começaram a desenvolver várias ferramentas bioinformáticas que vieram permitir a análise dos dados de sequenciação de modo a que estes tivessem uma tradução com significado biológico⁴².

Assim, para se começar a analisar qualquer sequência genómica, é necessário primeiramente definir qual a informação que se pretende obter para se selecionar quais as ferramentas a utilizar, criando assim uma *pipeline* analítica. Esta *pipeline* deverá ser estabelecida, respeitando determinadas etapas. A primeira etapa deverá ser a etapa de controlo de qualidade das leituras obtidas na sequenciação. A etapa seguinte consiste no alinhamento do genoma através do alinhamento das leituras tendo em conta um genoma de referência. Por fim segue-se a identificação e anotação de variantes e respetiva análise do interesse e relevância das mesmas⁴².

Controlo de qualidade das leituras

A avaliação da qualidade dos produtos de sequenciação é uma etapa essencial que deve preceder a análise dos mesmos. Esta etapa tem como objetivo remover, cortar e/ou corrigir as leituras de má qualidade que ocorrem normalmente devido a erros de leituras de bases ou contaminação com adaptadores entre outros problemas que podem ocorrer ao longo do processo de sequenciação. Atualmente, os sequenciadores avaliam a qualidade dos produtos de sequenciação através do índice probabilístico do algoritmo *Phread*, que permite definir uma estimativa da probabilidade de erro para cada base identificada⁴².

Montagem do genoma

A maioria das técnicas de sequenciação geram milhares de fragmentos de pequeno tamanho. Surge então o problema de como colocar os milhares de fragmentos obtidos após a sequenciação na ordem correta. A ordenação dos fragmentos é feita através do seu alinhamento tendo em conta um genoma de referência

que pode ser consultado, por exemplo, no site da *University of California Santa Cruz* (UCSC) ou no *Genome Reference Consortium* (GRC) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Atualmente existem programas de montagem (*assemblers*) que executam eficientemente a montagem dos fragmentos, organizando posteriormente a informação em ficheiros com o formato *sequence alignment map* (SAM)³⁹.

Anotação do genoma

A etapa que se segue à montagem é a etapa da anotação. Esta etapa consiste em identificar variantes no genoma em análise, discriminando o local, o tipo e o conteúdo dessas mesmas variantes. Existem diversas ferramentas bioinformáticas destinadas a esta tarefa, que se distinguem pelo tipo de variantes que detetam, nomeadamente *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *small insertions and deletions* INDELs, *structural variants* (SVs) e *copy-number variants* (CNVs). Após a identificação das variantes, são utilizadas ferramentas de anotação que vão permitir obter todo o tipo de informações sobre as variantes: frequências alélicas, alterações na sequência de proteínas, posição cromossómica etc. Estas informações vão permitir perceber qual o efeito e alterações causadas pelas variantes detetadas e se estas se irão expressar no fenótipo. Um dos programas mais utilizados para anotação é o *ANNOVAR*. Esta ferramenta tem diversas funcionalidades: anotar SNPs e INDELs, encontrar variantes em regiões conservadas, determinar a consequência funcional das variações encontradas, avaliar e filtrar subconjuntos de variantes desconhecidas, entre muitas outras. Finalizada a anotação é feita a visualização e validação dos resultados obtidos³⁹.

3.1.2.2 Estratégias de NGS para a realização do NIPT

As estratégias de NGS mais amplamente utilizadas no âmbito do NIPT são a *shotgun massively parallel sequencing* (s-MPS), a *targeted massively parallel sequencing* (t-MPS), e a pesquisa de *single nucleotid polymorphisms* (SNP).

A s-MPS é uma abordagem na qual se sequenciam todas as regiões informativas dos cromossomas. A t-MPS é uma abordagem semelhante alternativa, em que apenas se sequenciam cromossomas específicos, tendo como vantagem a diminuição do tempo e custos despendidos. Em ambas as abordagens não é possível distinguir o DNA materno do fetal^{43,44} (Figura 14).

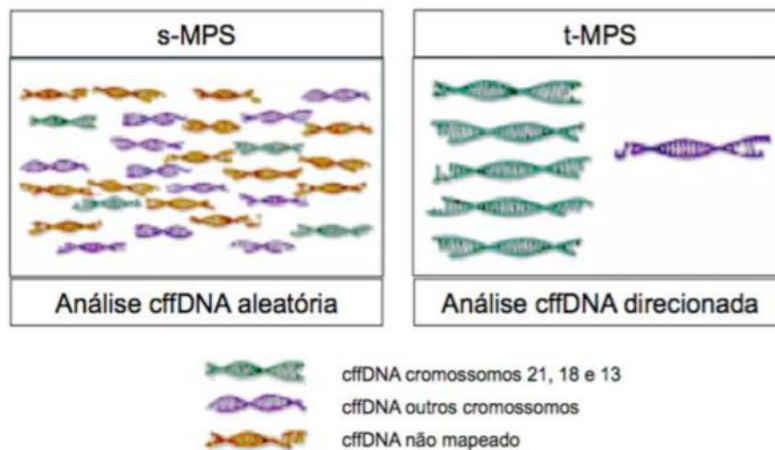


Figura 14 – Esquema ilustrativo da comparação das abordagens s-MPS e t-MPS. Adaptado de (42)

A abordagem por s-MPS permite, através da sequenciação paralela massiva, que milhões de fragmentos de DNA possam ser simultaneamente sequenciados, e tendo como referência toda a sequência do genoma humano, é possível identificar a origem cromossômica de cada fragmento⁴³. Se uma aneuploidia fetal estiver presente, deverá existir um excesso ou déficit relativo ao cromossoma em questão (Figura 14). Por exemplo, se estivermos perante uma trissomia 21, haverá um aumento relativo no número de cópias do cromossoma 21, em comparação com as de um feto euploide⁴⁴. Uma vez que o DNA fetal está presente em pequena percentagem no plasma materno, o excesso ou déficit relativo, encontrados nos casos de aneuploidias, não são muito significativos. Assim, para que se consigam detetar estas variações de forma confiável, a FF deve ser calculada, e é necessário um grande número de contagens, que deverão ser comparadas com as esperadas para casos euploides^{44,45}.

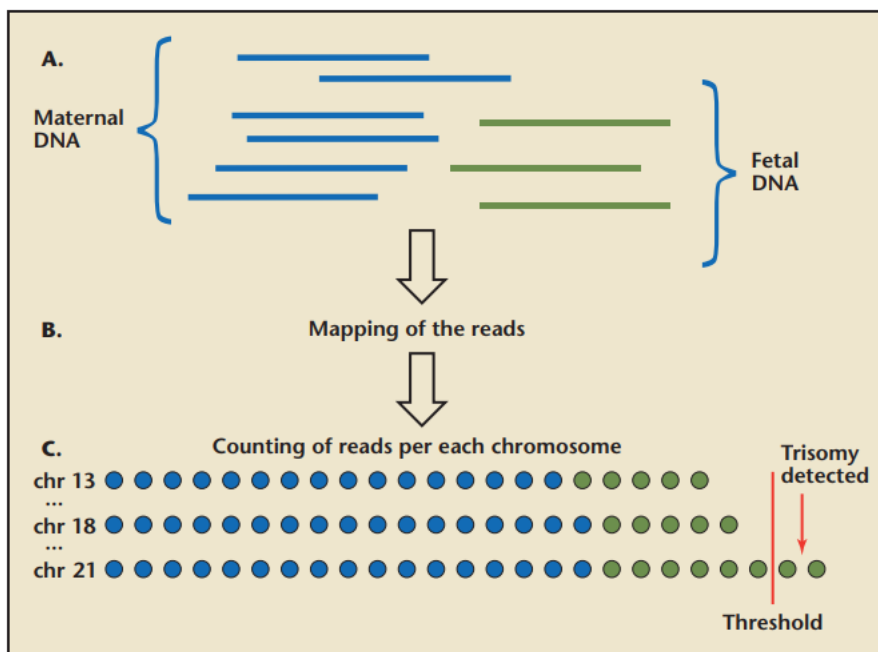


Figura 15 – Shotgun massively parallel sequencing para a deteção prenatal não invasiva de aneuploidias fetais. Adaptado de (35)

Na abordagem por t-MPS, como já referido anteriormente, amplificam-se seletivamente apenas as regiões cromossómicas de interesse (ex: cromossomas 21, 18 e 13) e, de seguida, avalia-se se existe um desvio da euploidia, com base no número relativo de contagens de fragmentos de DNA para o subconjunto de cromossomas selecionado⁴⁴. O principal fornecedor comercial desta abordagem inclui um ajuste para compensar a variabilidade na percentagem de DNA fetal, e combina os resultados do teste laboratorial com a idade materna, para fornecer o risco específico do feto para as aneuploidias analisadas.

Quanto à abordagem SNP, esta baseia-se em variações estáveis na sequência de DNA, em que um par de bases é substituído por outro – *single nucleotide polymorphism*. Um SNP distingue-se de uma mutação pontual por ter uma frequência igual ou superior a 1%⁴⁷. No genoma humano existem aproximadamente 10 a 30 milhões de SNPs, que constituem a principal fonte de diversidade, uma vez que cada indivíduo possui um vasto número de polimorfismos que fazem do seu património genético único. Assim, a aplicação desta metodologia ao rastreio pré-natal, baseia-se nas diferenças de SNPs entre o DNA materno e fetal. Através da amplificação direcionada para cromossomas de interesse e a análise de vários SNPs, é possível determinar o risco do feto ser portador de uma aneuploidia^{41,48}.

É possível também incluir uma amostra paterna, permitindo assim perceber qual a origem parental da alteração genética. Esta metodologia tem como vantagem o facto de permitir detetar triploidias. No entanto, devido ao facto de ser necessário comparar os genótipos materno e fetal, tem a desvantagem de não poder ser aplicada a gestações múltiplas, gestações com recurso a dadora de óvulos e ainda em

gestações em mulheres que já foram submetidas a transplante de órgãos. Como desvantagens apresenta o facto de ser por vezes necessário um exaustivo enriquecimento, sequenciação e amplificação do ADN fetal⁴⁸.

Na figura 15 encontra-se um esquema comparativo das três estratégias de NGS descritas.

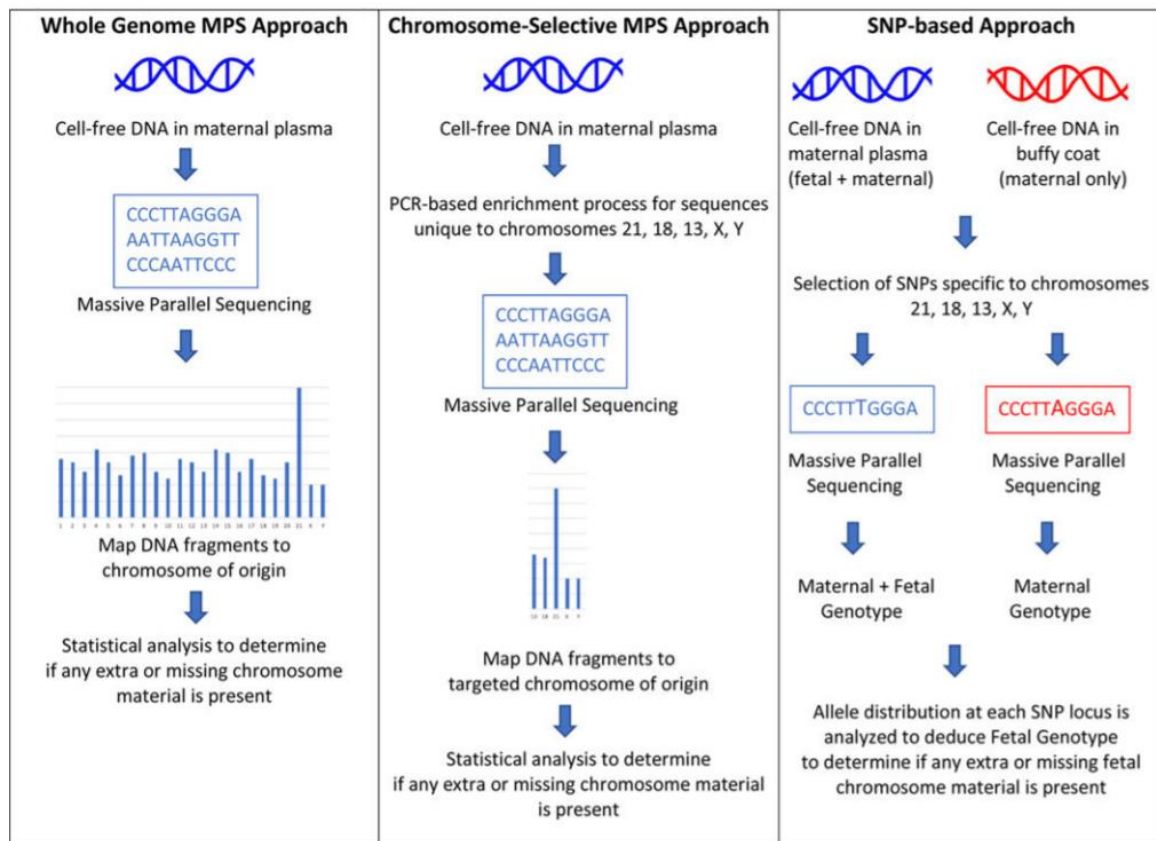


Figura 16 – Comparação das estratégias de NGS mais utilizadas no âmbito do NIPT: *shotgun massively parallel sequencing (s-MPS)*, a *targeted massively parallel sequencing (t-MPS)*, e a *single nucleotid polymorphism (SNP)*. Adaptado de (46)

Independentemente da estratégia utilizada, o relatório dos resultados deve sempre ser acompanhado da taxa de deteção, especificidade e valores preditivos positivo e negativo referentes à técnica utilizada. O valor preditivo positivo consiste na probabilidade de o indivíduo avaliado com um resultado positivo ser realmente afetado. O valor preditivo negativo consiste na probabilidade de um indivíduo avaliado com resultado negativo ser realmente normal/saudável.

Tão importante quanto a escolha da estratégia a utilizar, é a escolha da plataforma e ferramentas bioinformáticas para o tratamento dos resultados. Atualmente existem várias abordagens para expressar os resultados, nomeadamente o *Z-score* simples, o *Z-score* com correção de GC, o *Z-score* com correção de GC utilizando um controlo interno, o valor normalizado do cromossoma (CNV) e a Parental Support.

Na primeira abordagem que foi desenvolvida, os resultados são expressos através de um z-score simples que pode ser convertido na probabilidade de um cromossoma específico ser diferente do normal que é esperado. Apesar de ser possível converter o z-score numa probabilidade de risco, a maioria dos fornecedores comerciais deste teste apenas apresentam os resultados como sendo positivos ou negativos consoante o z-score exceda ou não os limites pré-definidos. Esta abordagem, não tem em consideração a variação do conteúdo em bases GC de cromossoma para cromossoma^{38,44}.

Outra das abordagens desenvolvidas foi o *Z-score* com correção de GC. A conclusão de que o conteúdo em bases GC de um determinado cromossoma influencia o quanto esse cromossoma é representado na amostra amplificada, levou ao desenvolvimento de um algoritmo informático que efetua uma contagem corrigida, tendo em conta este fator. Estudos comprovaram uma melhoria nas taxas de deteção para a T13 e T18, utilizando o *z-score* corrigido³⁸.

Uma abordagem mais recente, utiliza um cromossoma de referência interno específico para cada cromossoma analisado. O cromossoma de referência terá de ter idealmente um conteúdo em bases GC o mais semelhante possível ao do cromossoma que se pretende analisar. Um estudo recente obteve 100% de precisão na deteção de T13, T18, e T21 utilizando esta abordagem³⁸.

O CNV foi outra das abordagens desenvolvidas e consiste numa ferramenta que compara as leituras do cromossoma de interesse, com o número de contagens de um conjunto de amostras de referência. Este algoritmo permite diminuir a intra e inter-variabilidade entre as “corridas” de sequenciação³⁸.

Por fim, existe a ferramenta Parental SupportTM. Em contraste com os métodos quantitativos anteriormente referidos, esta ferramenta foca-se na medição dos SNPs. Através da análise de SNPs, esta abordagem permite obter várias informações de cada sequência lida, nomeadamente o número e identidade de cada alelo. A ferramenta incorpora a informação alélica da mãe e do pai (se disponível) e formula um conjunto de hipóteses (ex: trissomia, monossomia etc.) correspondente a diferentes padrões de herança genética. De seguida é calculada uma probabilidade para cada hipótese e por fim, através de outro teste estatístico, *L*, que é a razão da verosimilhança logarítmica, é selecionada a hipótese mais provável e é calculada a probabilidade dessa hipótese estar correta^{38,44}.

3.1.3. Aplicações na prática clínica

O NIPT permite por meio da análise do ADN fetal um vasto número de aplicações, das quais algumas serão descritas de seguida.

Rastreio de aneuploidias autossómicas e de aneuploidias dos cromossomas sexuais

Uma vez que o risco de aneuploidias fetais constitui a principal razão pela qual se realiza um diagnóstico pré-natal, o rastreamento das mesmas será talvez a aplicação clínica mais desejada e útil do NIPT. Segundo vários estudos, desde a sua introdução em 2011, que o NIPT tem revelado uma boa performance^{50,51,52}. Estes estudos avaliaram a sensibilidade e especificidade do NIPT para o rastreamento das principais aneuploidias, T21, T18 E T13, estando os resultados obtidos descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da performance do NIPT no rastreio das principais aneuploidias

Parâmetros de avaliação da performance (%)	Trissomia 21	Trissomia 18	Trissomia 13	Referências	Metodologia utilizada
Sensibilidade	99.1	100	91.7	Palomaki et al.	s-MPS
Especificidade	99.9	99.7	99.1		
Sensibilidade	100	97.2	78.6	Bianchi et al.	s-MPS
Especificidade	100	100	100		
Sensibilidade	100	97.4	-	Norton et al.	t-MPS
Especificidade	99.97	99.93	-		
Sensibilidade	100	100	100	Jiang et al.	s-MPS
Especificidade	100	99.9	100		
Especificidade	100	98	-	Ashoor et al.	t-MPS
Sensibilidade	100	100	-		

Os resultados obtidos demonstraram que o NIPT é um método altamente eficaz para o rastreio das principais aneuploidias, especialmente para a T21.

No que diz respeito ao rastreio de aneuploidias dos cromossomas sexuais, um estudo de Gil et al. revelou que a performance do NIPT é satisfatória embora não tão fidedigna como nos casos de aneuploidias autossómicas⁵¹. A taxa de deteção para a monossomia X é de 95,8%, sendo a taxa de falsos positivos de 0,14%⁵¹. Para as restantes aneuploidias dos cromossomas sexuais, tais como a síndrome de Klinefelter, ou a síndrome do triplo X, os dados existentes são ainda escassos para que se possa fazer uma correta avaliação da performance do teste²⁵.

Gravidez múltipla

O aumento da idade materna que se tem vindo a denotar nos últimos anos, juntamente com o aumento da recorrência do uso de técnicas de reprodução assistida, têm conduzido a uma maior incidência de gestações múltiplas. As gestações múltiplas representam um enorme desafio no que diz respeito ao rastreio pré-natal, uma vez que os fetos podem ser monozigóticos ou dizigóticos, sendo que no caso de serem dizigóticos, é necessário avaliar individualmente o risco que cada um tem de ter uma anomalia, uma vez que um poderá ter e o outro não⁵⁵. Este facto leva a que todos os métodos de rastreio tradicionais sejam menos precisos em casos de gestações múltiplas, em comparação com gestações unifetais. O NIPT não é exceção, tendo em conta que nos casos de gestações múltiplas, não se sabe qual a contribuição de cada feto para a cffDNA, e esta pode ser muito variável, levando a falsos resultados⁵⁶. Contudo, apesar desta limitação, já existem estudos encorajadores que obtiveram resultados semelhantes no rastreio de T21 em gestações de gémeos e gestações unifetais. Contudo mais estudos são necessários para que se possa comprovar que a aplicação do NIPT em casos de gestações múltiplas é viável⁵⁶.

Determinação do sexo fetal

Através da pesquisa de sequências específicas do cromossoma Y no plasma materno, é possível a determinação do sexo fetal, de forma não invasiva, a partir da sétima semana de gravidez. Esta aplicação é já realizada por diversos laboratórios, com uma sensibilidade de 95.4% e uma especificidade de 98.6%⁵⁵. O sexo fetal pode também ser determinado de forma não invasiva por ecografia, no entanto, normalmente apenas é possível detetar com precisão a partir das 12 semanas de gravidez. A vantagem do NIPT reside no facto de permitir uma determinação precoce do sexo fetal, o que se traduz na oportunidade de antecipar a toma de medidas terapêuticas, em situações em que o conhecimento antecipado do sexo fetal seja relevante, como por exemplo, nos casos de hiperplasia suprarrenal congénita, em que a administração de dexametasona antes das nove semanas impede a virilização fetal⁵⁶. Além disso, a determinação do sexo fetal por meio do NIPT é também essencial nos casos em que o feto apresenta genitais externos ambíguos, o que impossibilita o esclarecimento do sexo fetal por meio de ecografia²⁵.

Determinação do genótipo RhD

Nos casos em que as gestantes são RhD negativas e os fetos são RhD positivos, existe uma grande possibilidade de ocorrer a Doença hemolítica do feto e do recém-nascido. Apesar de a imunização ocorrer na maioria das vezes durante o parto, esta também pode ocorrer no início da gravidez, e levar a que haja hemorragia materno-fetal. A resposta imunológica pode levar a diversas consequências tais como anemia, hiperbilirrubinemia ou eritroblastose fetal, sendo que no pior cenário pode levar à morte fetal. Para prevenir estes acontecimentos, desde a década de 1990 que se aplica a administração profilática de

imunoglobulina anti-D a todas as grávidas RhD negativas quando o progenitor é RhD positivo⁵⁴. Esta medida permitiu diminuir drasticamente a taxa de imunização e consequentemente do aparecimento de doença hemolítica. No entanto, esta solução não é de todo ideal, uma vez que a imunoglobulina anti-D tem um custo elevado, e acarreta risco biológico para a grávida, pois é proveniente do sangue de dadores. Além disso, estima-se que 40% das mulheres RhD negativas recebem profilaxia desnecessariamente⁵⁵. Assim, a utilização do NIPT na prática clínica, para genotipagem RhD fetal, permite que a imunoprofilaxia seja realizada mais cedo e apenas nos casos em que é necessária, sendo a sensibilidade do teste de 99,5–99,8% e a especificidade de 94,0–99,5%⁵⁶. A metodologia aplicada passa por amplificar sequências do gene RhD nas grávidas RhD negativas. A presença de porções deste gene em circulação de grávidas RhD negativas, indica que o feto é RhD positivo. Esta aplicação já foi implementada no rastreio pré-natal de rotina em vários países como Canadá, Dinamarca, Holanda, Suécia, Finlândia, França e Alemanha⁵⁴.

O uso do NIPT para outras aplicações tais como a deteção de microdeleções e microduplicações ou o rastreio de doenças monogénicas encontra-se em desenvolvimento, mas para já, não é recomendado pela ACOG, sendo necessários mais estudos para que se possa validar e implementar a sua utilização^{53,54}.

3.1.4. Vantagens, desvantagens e limitações

O NIPT apresenta como principais vantagens em relação aos testes de diagnóstico disponíveis, o facto de não ser invasivo, e, portanto, não acarretar risco de perda fetal aliado ao facto de poder ser realizado numa fase precoce da gravidez (9–10 semanas)⁵¹. Em comparação com os testes de rastreio bioquímico, o NIPT revelou ser um teste mais preciso, apresentando uma sensibilidade entre 90–99% e uma especificidade entre 99–100% com uma taxa mínima de falsos positivos (0,09–0,13%)⁵¹. Além disso, para a realização do NIPT apenas é necessária uma única colheita de sangue, ao contrário dos rastreios bioquímicos que requerem múltiplas análises sanguíneas.

Outra das vantagens consiste nas inúmeras aplicações do NIPT, que para além de possibilitar o rastreio de diversas anomalias cromossómicas, permite ainda outras aplicações tais como: a determinação do sexo fetal, a determinação do genótipo RhD fetal etc⁵⁵.

Embora a partida pareça um teste largamente vantajoso, o NIPT apresenta, contudo, algumas desvantagens. A sua principal desvantagem reside no facto de não ser preciso o suficiente para ser considerado um teste de diagnóstico, motivo pelo qual, atualmente, quase todas as diretrizes de prática clínica recomendam que todos os testes não invasivos com resultado positivo sejam confirmados por um teste diagnóstico invasivo. Além desta desvantagem, têm surgido também algumas questões éticas. Uma delas prende-se com a possibilidade de o NIPT ser utilizado para a determinação de características fenotípicas não patológicas. No seio da comunidade médica, teme-se que futuramente se possa utilizar

este teste para selecionar determinadas características de interesse nos bebés⁵⁷. Outra das questões reside no facto de muitos países não terem um financiamento público do teste, levando a que possa existir iniquidade no seu acesso e consequentemente desigualdade de cuidados pré-natais entre as mulheres⁵⁶.

Outra das desvantagens prende-se das preocupações está relacionada com a decisão da mulher em fazer ou não o teste. Ao lhe ser apresentado um teste simples, rápido e preciso, que não apresenta qualquer risco, a mulher poderá ter a percepção de que não há qualquer desvantagem em fazê-lo, considerando-o como apenas “mais uma análise ao sangue”. Isto poderá levar a que várias mulheres realizem o NIPT sem estarem devidamente conscientes da sua importância ou implicações. Atualmente considera-se que os sistemas de cuidados de saúde não estão ainda devidamente preparados para informar e aconselhar adequadamente as mulheres em relação ao NIPT, de forma que possam tomar decisões autonomamente e fazer uma escolha informada⁵³.

3.1.5. Limitações

Apesar de vários estudos terem já confirmado que o NIPT apresenta elevada especificidade e sensibilidade, existem também algumas limitações que conduzem por vezes a resultados falsos positivos, falsos negativos ou até a resultados ininterpretáveis tais como:

- Fração fetal insuficiente – uma baixa fração fetal pode conduzir a resultados nulos ou a falsos negativos. Como já referido anteriormente, a fração fetal aumenta com a idade gestacional e relaciona-se inversamente com o peso da grávida. Porém, têm surgido novas evidências de que existem outros fatores influenciadores. Assim, a fração fetal parece ser menor nos casos em que há a presença de anomalias cromossómicas fetais, nomeadamente no caso das trissomias 13 e 18, da monossomia X e triploidias. Há, portanto, um risco aumentado de nestes casos o NIPT falhar, pela fração fetal disponível ser insuficiente⁵⁴.
- Gravidez gemelar – num caso de gravidez de gémeos, um dos fetos poderá ser afetado por uma anomalia e o outro não, o que condiciona os resultados. Podem também existir casos em que um dos fetos seja aneuploide e não sobreviva, mas a sua placenta ainda não tenha sido totalmente absorvida no momento do teste, continuando a libertar cfDNA para o plasma materno e conduzindo a um resultado falso positivo⁵⁵.
- Alterações maternas – a presença de determinadas alterações na mãe podem levar a resultados falsos positivos, nomeadamente anomalias cromossómicas constitucionais em mosaico, a presença de medula ou tecido transplantado, e em casos mais raros, cancro^{54,55}.

- Situações de mosaicismos – o mosaicismos confinado à placenta ou o mosaicismos fetal (discrepância de genótipos entre o feto e a placenta) podem levar a resultados falsos positivos ou falsos negativos respetivamente⁵⁵.

3.1.6. Modelos de implementação na prática clínica e relação custo-efetividade

Desde a introdução do NIPT que não existe ainda uma norma consistente que defina a sua aplicação, no entanto, vários modelos já foram propostos. Dentre eles, existem três que são os que reúnem um maior consenso e que se encontram esquematizados na figura 12.

Uma primeira abordagem propõe a utilização do teste não invasivo como rastreio de primeira linha. Este é o chamado modelo universal, e sugere que o NIPT seja oferecido a todas as grávidas, juntamente com a ultrassonografia, entre as 10-12 semanas de gestação. Este modelo é o que proporciona melhores taxas de deteção de anomalias fetais, contudo, é o modelo mais dispendioso. Além disso, abandonar o tradicional rastreio sérico de marcadores bioquímicos faria com que se perdesse informação importante no que diz respeito a algumas complicações na gravidez como a pré-eclampsia, fornecida pelo doseamento da PAPP-A⁵⁷. Por estes motivos, este modelo não foi até agora bem aceite⁵⁵.

Uma segunda proposta, sugere que o NIPT seja implementado como teste de segunda linha de rastreio, isto é, que apenas seja disponibilizado às grávidas consideradas de alto risco, ou seja, aquelas que obtiveram um resultado positivo nos testes de rastreio tradicionais. Assim, as gestantes poderão optar por realizar um segundo teste de rastreio não invasivo antes de considerarem se avançam ou não para um teste diagnóstico. Se optarem por o fazer, apenas as grávidas com resultado positivo no NIPT são aconselhadas a prosseguir para um teste diagnóstico. Este modelo, conhecido como modelo avançado, tem o objetivo de reduzir o número de procedimentos invasivos realizados, no entanto, a taxa de deteção de anomalias seria menor, uma vez que o rastreio bioquímico apenas deteta 80-90% das alterações^{58,59}. Apesar disto, estima-se que neste modelo apenas 5% das grávidas realizariam NIPT, o que faz com que este modelo apresente uma relação custo-efetividade bastante razoável⁵⁸. Por fim, foi também proposto o modelo contingente. Este modelo propõe que a realização do NIPT seja condicionada ao resultado do RCPT. Assim, após a realização do RCTP as gestações são estratificadas em três categorias: baixo-risco, risco intermédio e alto risco. O que se sugere é que às grávidas de baixo risco não seja recomendado qualquer outro teste, às grávidas de alto risco sejam oferecidos testes de diagnóstico invasivos, ou o NIPT, e às grávidas de risco intermédio seja oferecido apenas o NIPT. O objetivo é que através do NIPT se possa reclassificar as gestações de risco intermédio como sendo de baixo ou alto risco, facilitando assim a decisão de avançar ou não para um teste diagnóstico. Este modelo parece resultar de um equilíbrio entre os modelos anteriores, pois além de conservar as vantagens da ecografia e do rastreio bioquímico,

traduzir-se-ia numa elevada taxa de detecção de anomalias, numa baixa taxa de realização de procedimentos invasivos e a um custo muito menor do que o do modelo universal^{58,59}.

Assim, o modelo contingente parece ser o que reúne mais vantagens e menos desvantagens, tendo sido o modelo adotado por todos os países da Europa Nórdica, embora com diferentes critérios e recomendações. Na Noruega, por exemplo, o RCPT apenas é realizado às grávidas acima dos 38 anos de idade ou com história de complicações prévias, o que inclui aproximadamente 10% de todas as gestantes. Destes 10% apenas 1% são consideradas de alto risco, ou seja, apenas 1% realizam o NIPT⁶⁰.

Na Holanda e Bélgica, o NIPT foi implementado segundo o modelo universal, ou seja, como teste de primeira linha, embora com algumas diferenças. Enquanto na Holanda, o NIPT é oferecido sem o RCPT, na Bélgica, o NIPT é oferecido em conjunto com ecografia (com medição da TN), mas sem rastreio bioquímico⁶⁰.

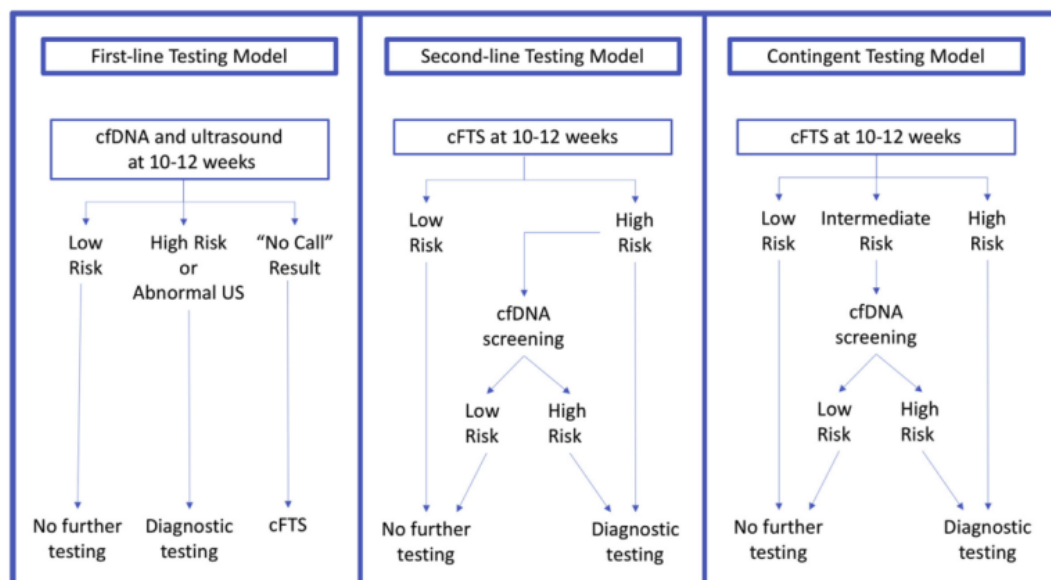


Figura 17 – Diferentes modelos propostos para a implementação do NIPT na prática clínica. Adaptado de (46)

Na América, a ACOG apenas recomenda o NIPT como teste de rastreio secundário, em gestações com alto risco pré-teste, definidas pelos seguintes critérios: grávidas com idade igual ou superior a 35 anos, gravidez prévia com trissomia ou outras alterações, fetos com achados ecográficos sugestivos, rastreio do 1º ou 2º trimestre positivos e um dos progenitores ser portador de translocação robertsoniana^{55,59}. O uso do NIPT nos EUA não é comparável à Europa, uma vez que nos EUA depende principalmente das companhias de seguros privadas e das políticas estaduais do *Medicaid*. Os programas *Medicaid* cobrem o NIPT para as gestantes de alto risco, no entanto, mais de setenta milhões de mulheres são asseguradas por companhias de seguros que não cobrem o NIPT⁵⁹.

Na Austrália o NIPT pode ser usado como rastreio de primeira linha, em alternativa ao RCPT. No entanto, encontram-se neste momento dois modelos propostos para revisão estatal: modelo universal

com o NIPT como rastreio de primeira linha, e um modelo contingente com o NIPT condicionado ao resultado RCPT⁶⁰.

Em Portugal, assim como em Espanha, Alemanha e Inglaterra, o NIPT não faz parte ainda do plano de rastreio pré-natal oferecido pelos sistemas públicos de saúde, no entanto, o teste é atualmente oferecido por vários laboratórios privados, para as grávidas que o desejarem realizar⁵⁷. Nestes países, uma correta informação e orientação por parte dos ginecologistas/obstetras continua a ser a única ferramenta ao dispor das gestantes para decidirem ou não realizar este tipo de procedimento.

No que diz respeito a custos, o NIPT é ainda de um modo geral um teste dispendioso. O preço do teste varia internacionalmente e depende muito da sua finalidade (que anomalias deteta etc.) e do modo como é comercializado⁶¹. Atualmente, o preço do teste no Canadá varia entre 470–679€, nos Estados Unidos varia entre 512–683€ e no Reino Unido varia entre 436–1746€. Nos países europeus, o teste custa entre 260–770€⁶². Em Portugal o preço do NIPT para o despiste apenas das principais trissomias (T21, T18, T13) ronda os 370€. Estes valores encontram-se acima dos valores exigidos para a realização do rastreio bioquímico e até mesmo do cariótipo fetal. O rastreio bioquímico custa entre 30–40€, embora se as grávidas o fizerem num hospital público ou se forem remetidas por um a uma das clínicas convencionadas, não pagam. O cariótipo fetal tem atualmente um custo que ronda os 164€⁶³.

Das várias análises realizadas até ao momento em diversos países, que se debruçaram sobre o impacto económico da introdução do NIPT na prática clínica, as conclusões obtidas foram semelhantes. Concluiu-se que a utilização do NIPT como teste de primeira linha aumenta efetivamente o número de anomalias fetais detetadas e diminui o número de perdas fetais associada a realização de procedimentos invasivos, no entanto, o custo em comparação com os testes de rastreio pré-natal em vigor é muito alto. Quanto à utilização do NIPT como teste contingente, revelou-se menos eficaz, com uma menor taxa de deteção de anomalias fetais, no entanto, permitiu reduzir significativamente o número de procedimentos invasivos realizados e como tal o número de perdas fetais associadas aos mesmos também, e a um custo muito inferior. Claro está que o custo do NIPT não é estanque, sendo que, com o aumento da concorrência e o aprimoramento das tecnologias, este teste tenderá a ser menos dispendioso. Alguns autores defendem também que os testes não invasivos terão um custo menor para o sistema de saúde público do que aquele que é anunciado pelos laboratórios privados, que inclui naturalmente uma margem substancial de lucro. Assim, considera-se atualmente que implementar o NIPT como teste contingente seria a alternativa com melhor relação custo-benefício, no entanto, a expectável diminuição do custo do NIPT poderá levar a que no futuro a sua implementação como teste de primeira linha seja a melhor opção^{63,64}.

4. Discussão

O rastreio pré-natal visa a deteção precoce do risco de anomalias congénitas no feto, com o objetivo de permitir aos progenitores decidir quanto à continuidade da gestação e/ou quanto a eventuais atitudes terapêuticas, quando aplicável. Em 2007, foi introduzida a lei que permite a IVG por opção da mulher, embora já fosse permitida, desde 1987, em casos de malformação fetal. O RENAC divulgou no relatório referente ao período de 2016/2017, que em 74,8% dos casos em que foram detetadas anomalias cromossómicas no feto, os pais optaram pela IVG⁷. Isto demonstra que a maioria dos progenitores, tendo atempadamente o conhecimento de que o seu feto é portador de uma anomalia cromossómica, opta por não prosseguir com a gravidez. A IGV apenas é permitida, em casos de malformação fetal, até as 24 semanas de gestão, pelo que, cada vez mais se exige que os métodos de rastreio e diagnóstico pré-natal permitam uma deteção cada vez mais precoce de anomalias fetais, de modo a fornecer uma janela temporal confortável para que os progenitores possam ponderar as suas decisões. Outro dado importante, revelado pelo RENAC de 2016/2017, foi de que a frequência da realização de exames invasivos foi de 4,1%, valor superior ao de anos anteriores. Além disso, 3% dos pais recusaram a realização de um exame invasivo, perante a suspeita de uma malformação fetal⁷. Estes factos vêm reforçar a noção de que os métodos diagnósticos invasivos suscitam ainda dúvidas e receio nos progenitores, mas representam atualmente ainda o único meio de confirmação diagnóstica de uma anomalia fetal. A procura por métodos menos invasivos e mais seguros e confiáveis tem sido, nos últimos anos, a maior aspiração na área do DPN.

A descoberta de DNA fetal livre em circulação materna, veio abrir portas ao desenvolvimento de um método não invasivo, o NIPT. A base deste método consiste em rastrear anomalias fetais através do cfDNA existente no plasma materno. Para tal, são utilizadas atualmente as tecnologias de NGS através de diferentes estratégias, sendo as mais utilizadas a s-MPS, a t-MPS e a SNP's. Cada uma destas estratégias apresenta vantagens e desvantagens. Atualmente a s-MPS é a estratégia que se encontra mais amplamente validada no que diz respeito à sensibilidade e especificidade, no entanto, os custos e trabalho inerentes à sequenciação de todo o genoma têm feito com que as abordagens direcionadas ganhem cada vez mais destaque.

Nos últimos anos, têm sido investigadas outras metodologias para a realização do NIPT. Um grupo obteve bons resultados através da identificação de regiões diferencialmente hipermetiladas do cromossoma 21 fetal em comparação com o materno, recorrendo à imunoprecipitação de DNA metilado (MeDiP). Utilizando a MeDiP em combinação com a quantificação por PCR em tempo real, os investigadores conseguiram identificar corretamente os casos de T21, com 100% de sensibilidade e especificidade. As técnicas de MeDiP e PCR em tempo real são significativamente menos dispendiosas

do que a MPS, constituindo uma abordagem promissora para o DPN não invasivo de aneuploidias, contudo, são ainda necessários mais estudos em grande escala para que se possa introduzir esta estratégia na prática clínica.

Em comparação com os atuais métodos de DPN, o NIPT apresenta a grande vantagem de ser um teste não invasivo, e como tal, não acarreta o risco de perda fetal. Além disso, pode ser realizado numa fase muito precoce da gravidez (9-10 semanas). Em comparação com os testes de rastreio bioquímico, o NIPT revelou ser mais específico e sensível, acumulando ainda a vantagem de apenas ser necessária uma única colheita de sangue para a sua realização. Apesar de todas estas vantagens, o NIPT apresenta algumas limitações que podem conduzir a resultados falsos-positivos, falsos-negativos ou ininterpretáveis. Por esta razão, o NIPT não é considerado um teste diagnóstico, sendo atualmente classificado como teste de rastreio, e como tal, um resultado de NIPT positivo deve sempre ser confirmado através de um método diagnóstico invasivo antes de ser tomada qualquer decisão quanto à gestação.

A evidência cumulativa de vários estudos, sugere que o NIPT pode ser introduzido com segurança nos algoritmos de rastreio pré-natal. Para a sua implementação na prática clínica, foram propostos três modelos: o modelo universal, o modelo avançado e o modelo contingente. Até agora, o modelo contingente parece ser o mais adotado a nível internacional, pelos países que já utilizam o NIPT na prática clínica. Contudo, dentro do mesmo modelo existem variações nas regras e critérios definidos por cada país. Em Portugal, o NIPT não se encontra ainda implementado na prática clínica. Para que tal aconteça, é necessário que se definam regras no que diz respeito a questões como: em que circunstâncias esta modalidade de rastreio deve ser oferecida, de que modo deve ser feito o aconselhamento pré e pós teste, como deve ser obtido o consentimento informado, que resultados devem ser reportados e de que forma etc. Existem atualmente diretrizes definidas por algumas entidades internacionais, como a ACOG, que podem ajudar a dar resposta a estas questões e a regulamentar a implementação do NIPT em Portugal.

No que diz respeito a custos, o NIPT é um teste considerado dispendioso, sendo atualmente mais caro do que o rastreio bioquímico e do que o cariótipo fetal. Contudo, com a constante evolução da eficiência das tecnologias prevê-se que o seu custo venha a diminuir, viabilizando ainda mais a sua ampla utilização.

Apesar de ter revelado várias potencialidades, existe ainda um longo caminho a percorrer para que o NIPT possa vir a ser uma alternativa aos métodos de diagnóstico convencionais. Contudo, tem-se revelado uma boa alternativa como método de rastreio.

O NIPT encontra-se atualmente em constante crescimento e expansão, à medida que são publicados mais estudos que confirmam a sua fiabilidade. Apesar de este teste, só poder ainda ser aplicado, com alta precisão, ao rastreio das principais aneuploidias, as últimas pesquisas têm-se desenvolvido no sentido de averiguar a sua aplicabilidade no diagnóstico de outras condições. Estudos recentes têm investigado a viabilidade de aplicação do NIPT no rastreio de doenças monogénicas e na deteção de microdeleções e

microduplicações que estão na base de condições clínicas como a síndrome de Di-George e de Prader-Willi³⁵.

Ultimamente, têm também sido desenvolvidas pesquisas promissoras que apontam para o uso do cfDNA como biomarcador para o diagnóstico precoce de pré-eclâmpsia e outras complicações na gravidez. Esta investigação advém da descoberta de que mudanças quantitativas no cffDNA no plasma materno são indicadores de pré-eclâmpsia iminente. Pensa-se que este fenómeno ocorra devido à isquemia placentar, que provoca a apoptose acelerada das células trofoblásticas e consequentemente o aumento da libertação de cffDNA.

5. Referências Bibliográficas

- 1.Regateiro FJ. Manual de Genética Médica.Coimbra IU, editor. Coimbra; 2007.
- 2.Gersen SL, Keagle MB. The principles of Clinical Cytogenetics. Press H, editor. New Jersey; 2005.
- 3.TJIO JH, LEVAN A. the Chromosome Number of Man. Hereditas. 1956.
- 4.Barr ML. The sex chromosomes in evolution and in medicine. Can Med Assoc J. 1966;1137–48.
- 5.Behrend C, Hagh JK, Mehdipour P, Schwanitz G. Human Chromosome Atlas: introduction to diagnostics of structural aberrations. Springer; 2017.
- 6.Pierce BA. Genetics Essentials: Concepts and connections. Freeman WH, editor. 2009.
- 7.Braz P, Machado A, Dias CM. Registo Nacional de Anomalias Congénitas. 2017.
- 8.Rafii MS, Kleschevnikov A., Sawa M, Mobley WC. Down syndrome. Handb Clin Neurol [Internet]. 2019;167(1):321–36. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1706537%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-53042-2.00261-3>
- 9.Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "down syndrome: An insight of the disease." J Biomed Sci [Internet]. 2015;22(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-015-0138-y>
- 10.Rosa RFM, Rosa RCM, Zen PRG, Graziadio C, Paskulin GA. Trissomia 18: Revisão dos aspectos clínicos, etiológicos, prognósticos e éticos. Rev Paul Pediatr. 2013;31(1):111–20.
11. Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2012;7(1):1. Available from: Orphanet Journal of Rare Diseases
- 12.Goel N, Morris JK, Tucker D, Walle HEK De, Bakker MK, Kancherla V, et al. Population Based Analysis. 2019;179(12):2382–92.

13. Almeida C, Costa F, Graça P, Menezes B, Mota E, Oliveira D, et al. Programa nacional para a vigilância da gravidez de baixo risco. Direção Geral da Saúde. 2015. 23–96 p.
14. Tavares F. Programa de rastreios da Região Norte. 2009;1–70.
15. Associação para o planeamento da família. Aborto e interrupção da gravidez [Internet]. [cited 2021 Jun 5]. Available from: <http://www.apf.pt/aborto-e-interruptao-da-gravidez>
16. Bernal LM, López G. Diagnóstico prénatal: retrospectiva. Nov publ cient. 2014;12(21):23–36.
17. Henriques S. Rastreio pré-natal de cromossomopatias e defeitos do tubo neural. Como actuar? Rev Port Clínica Geral. 2009;25(3):312–8.
18. Graça LM da. Nem confiança excessiva, nem perplexidade injustificada: Algumas questões sobre rastreio pré-natal de aneuploidias. Acta Obs Ginecol Port. 2007;1(1):19–29.
19. Laura M. Carlson, MD* and Neeta L. Vora M. Prenatal Diagnosis: Screening. Physiol Behav [Internet]. 2017;176(10):139–48. Available from: <file:///C:/Users/Carla%0ACarolina/Desktop/Artigos%0Apara%0Aacrescentar%0Ana%0Aqualificaçãõ/The%0Aimpact%0Aof%0Abirth%0Aweight%0Aon%0Acardiovascular%0Adisease%0Arisk%0Ain>
20. Palka C, Guanciali-Franchi P, Morizio E, Alfonsi M, Papponetti M, Sabbatinelli G, et al. Non-invasive prenatal screening: A 20-year experience in Italy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X [Internet]. 2019;3:100050. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eurox.2019.100050>
21. Maternidade Dr. Alfredo da Costa. Protocolos de Atuação da Maternidade Dr. Alfredo da Costa. 2017;392. Available from: <https://www.lidel.pt/pt/catalogo/ciencias-da-saude/obstetricia/protocolos-de-atuacao-da-maternidade-dr-alfredo-da-costa-2/>
22. Marques SHM. Adn fetal livre no sangue materno e diagnóstico pré-natal não invasivo Acta Obs Ginecol Port [Internet]. 2012;133–9. Available from: http://www.fspog.com/fotos/editor2/1_ficheiro_609.pdf
23. Gomes AC. Importância do estudo genético pré-natal. 2012;

24. Direção Geral da Saúde. Circular Normativa No: 6/DSMIA. 1997;
25. Cheng WL, Hsiao CH, Tseng HW, Lee TP. Noninvasive prenatal diagnosis. Taiwan J Obstet Gynecol [Internet]. 2015;54(4):343–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2015.05.002>
26. Victor B, Martins WP. Recomendações Práticas ISUOG : procedimento invasivo para diagnóstico pré-natal. Isuog [Internet]. Available from: <https://www.isuog.org/uploads/assets/uploaded/5eee951a-74dc-4863-885e28760dfebbbb.pdf>
27. Babu, Arvind; Verma RS. Human Chromosomes: principles and techniques. New York: McGraw-Hill; 1995.
28. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. Am J Med Genet Part C Semin Med Genet. 2007;145(1):87–98.
29. Wippold FJ, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: Fluorescence in situ hybridization. Am J Neuroradiol. 2007;28(3):406–10.
30. Willis, A.S; Veyver, I; Eng C. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and Prenatal diagnosis. Prenat Diagn. 2012;28:315–20.
31. Massalska D, Bijok J, Zimowski JG, Jozwiak A, Jakiel G, Roszkowski T. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) – new possibilities. Ginekol Pol. 2013;84(6):461–4.
32. Gardner, R.; Sutherland G. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 4th ed. New York: Oxford University press; 2012.
33. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(9):3279–83.
34. Goldberg JD. Fetal cells in maternal circulation: Progress in analysis of a rare event. Am J Hum Genet. 1997;61(4):806–9.
35. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. Rev Obstet Gynecol [Internet]. 2013;6(2):48–62. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466384><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3893900>

36. Pös O, Budiš J, Szemes T. Recent trends in prenatal genetic screening and testing. *F1000Research*. 2019;8(May):764.

37. Kinnings, S. L.; Geis, J. A., Almosri, E.; Wang, H.; Guan, X.; Mccullough RM. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. 2015;

38. Peng XL, Jiang P. Bioinformatics approaches for fetal DNA fraction estimation in noninvasive prenatal testing. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).

39. Van Beek DM, Straver R, Weiss MM, Boon EMJ, Huijsdens-van Amsterdam K, Oudejans CBM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. *Prenat Diagn*. 2017;37(8):769–73.

40. Cserhati M. Calculation of fetal fraction for non-invasive prenatal testing. *BioTech*. 2021;10(3).

41. Kumar S, Banks TW, Cloutier S. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *Int J Plant Genomics*. 2012;2012.

42. Fietto JLR, Maciel TEF. Sequenciando genomas. *Ciências genômicas Fundam e Apl*. 2015;27–64.

43. Boon EMJ, Faas BHW. Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013;33(6):563–8.

44. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: Current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;42(1):15–33.

45. Andari V. Testes genéticos não invasivos no pré-natal. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2015.

46. Van den Veyver IB, Eng CM. Genome-wide sequencing for prenatal detection of fetal single-gene disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(10).

47. Go ATJ, van Vugt JMG, Oudejans CBM. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: Recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update*. 2011;17(3):372–82.
48. Carbone L, Cariati F, Sarno L, Conforti A, Bagnulo F, Strina I, et al. Non-invasive prenatal testing: Current perspectives and future challenges. *Genes (Basel)*. 2021;12(1):1–12.
49. Anderson, Deborah K., Liang JW and CL. Screening for fetal chromosomal and subchromosomal disorders. *Physiol Behav*. 2017;176(5):139–48.
50. Swanson A, Sehnert AJ, Bhatt S. Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assays and Implementation Strategies for Women’s Healthcare Practitioners. *Curr Genet Med Rep*. 2013;1(2):113–21.
51. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(3):302–14.
52. 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. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2012;206(4):322.e1–322.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.01.0>
53. Suci ID, Toader OD, Galeva S, Pop L. Non-Invasive Prenatal Testing beyond Trisomies. *J Med Life*. 2019;12(3):221–4
54. Saramago P, Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Palmer S, et al. High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women not known to be sensitised to the RhD antigen: A systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2018;22(13):1–10.
55. Woolcock J, Grivell R. Noninvasive prenatal testing. *Aust Fam Physician*. 2014;43(7):432–4.
56. Hui L. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA – New implications for maternal health. *Obstet Med*. 2016;9(4):148–52.

57. Samura O, Okamoto A. Causes of aberrant non-invasive prenatal testing for aneuploidy: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2020;59(1):16–20.
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.11.003>
58. Lutgendorf MA, Stoll KA, Knutzen DM, Foglia LM. Noninvasive prenatal testing: Limitations and unanswered questions. *Genet Med*. 2014;16(4):281–5.
59. Brady P, Brison N, Van Den Bogaert K, de Ravel T, Peeters H, Van Esch H, et al. Clinical implementation of NIPT – technical and biological challenges. *Clin Genet*. 2016;89(5):523–30.
60. Gadsbøll K, Petersen OB, Gatinois V, Strange H, Jacobsson B, Wapner R, et al. Current use of noninvasive prenatal testing in Europe, Australia and the USA: A graphical presentation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020;99(6):722–30.
61. Bayón JC, Orruño E, Portillo MI, Asua J. The consequences of implementing non-invasive prenatal testing with cell-free foetal DNA for the detection of Down syndrome in the Spanish National Health Service: A cost-effectiveness analysis. *Cost Eff Resour Alloc* [Internet]. 2019;17(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12962-019-0173-8>
62. Zhang W, Mohammadi T, Sou J, Anis AH. Cost-effectiveness of prenatal screening and diagnostic strategies for down syndrome: A microsimulation modeling analysis. *PLoS One*. 2019;14(12):1–17.
63. Ministério da Saúde Despacho n.o 14159/2012 [Internet]. 2012 [cited 2021 Oct 5]. Available from: https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/01/Tabela_Precos_INSA.pdf
64. Juvet LK, Contained in (work): Juvet LK, Folkehelseinstituttet (Norway). Område for helsetjenester, Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten. Non-invasive prenatal test (NIPT) for identification of trisomy 21, 18 and 13 : health technology assessment