

The new era of prenatal screening

A nova era do rastreio pré-natal

Patrícia Almeida*, Sofia Franco**, Nuno Guerra***, Paulo Moura****
Serviço de Obstetrícia/Maternidade Dr. Daniel de Matos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Abstract

Trisomies of chromosomes 21, 18 and 13 are responsible for 70% of all prenatally detected aneuploidies. Prenatal diagnosis involves an invasive procedure which provides information about euploid *versus* aneuploid status, but it is expensive and has risks. For these reasons diagnostic tests are only used in up to 5-10% of the population. In order to minimize maternal and fetal risks, screening tests are offered to pregnant women. Traditional screening tests have high detection rates although not comparable to diagnostic procedures accuracy. Recent data has validated the analysis of free fetal DNA in maternal blood as a new screening method for fetal aneuploidies, thus providing detection rates similar to diagnostic methods, while maintaining the safety of a screening test.

Keywords: Fetal DNA; Prenatal screening; Non-invasive screening; Aneuploidies.

INTRODUÇÃO

É atualmente consensual que se deve oferecer a qualquer mulher grávida uma avaliação do risco de aneuploidias fetais, independentemente da sua idade. As metodologias de rastreio convencionais, como o dosagem de marcadores bioquímicos no sangue materno ou os marcadores ecográficos, podem identificar fetos em risco para aneuploidias com sensibilidades até 85-90% e uma taxa de falsos positivos (FP) de 3 a 5%¹. Perante um resultado positivo de um teste de rastreio oferecer-se-á a possibilidade de um teste diagnóstico, o qual constitui ainda, inevitavelmente, um procedimento invasivo. Tais procedimentos são dispendiosos, requerem assistência pré-natal diferenciada e implicam, consoante a técnica, um risco de abortamento entre 0,3² e 2%³, não devendo ser oferecidos indiscriminadamente a toda a população grávida. A possibilidade de uma abordagem alternativa, não invasiva e, portanto, isenta de riscos obstétricos será, com toda a certeza, um dos

grandes objetivos e conquistas em diagnóstico pré-natal (DPN). Os primeiros passos desta nova era em DPN foram dados por *Schmorl* nos finais do século XIX com a descoberta de material fetal em tecidos maternos e sedimentados nas últimas 3-4 décadas com a identificação de células fetais e isolamento de ácido desoxirribonucleico (ADN) fetal livres na circulação materna.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na PubMed utilizando as palavras-chave «non-invasive prenatal testing», «non-invasive prenatal screening» e «fetal DNA». Foram selecionados 31 artigos publicados entre 2009 e Junho de 2013.

NOTA HISTÓRICA

A descoberta de células fetais na circulação periférica materna na década de 70⁴ foi, sem dúvida, um grande passo em DPN, contudo, dificuldades no seu isolamento limitaram a sua aplicação clínica. Em 1997 ressurgiram as esperanças, quando *Lo* e col. identificaram ADN fetal (ADNf) livre na circulação materna e, em 2008, *Chiu* e *Fan* detetaram uma hiperexpressão de material derivado do cromossoma 21 em gestações com

*Interna do Internato Complementar de Obstetrícia e Ginecologia

**Assistente Hospitalar de Obstetrícia e Ginecologia, Maternidade Dr. Daniel de Matos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

***Assistente Hospitalar Graduado de Obstetrícia e Ginecologia, Maternidade Dr. Daniel de Matos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

****Professor Associado da FMUC, Chefe Obstetrícia e Ginecologia, Maternidade Dr. Daniel de Matos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

fetos afetados por trissomia (T) 21⁵. Estas descobertas impulsionaram as investigações na área do rastreio pré-natal não invasivo.

MATERIAL FETAL NA CIRCULAÇÃO MATERNA

O rastreio pré-natal não invasivo utiliza como matéria-prima material genético fetal (células fetais íntegras ou ácidos nucleicos de origem fetal) obtido a partir da circulação materna, conseguindo detetar determinadas condições genéticas ou patologias no decurso da gestação.

O ADN surge na circulação periférica em resultado da apoptose celular, verificando-se um aumento da sua quantidade em situações de lesão tecidual ou de maior renovação celular. Na circulação periférica de grávidas, além de fragmentos de ADN materno, com mais de 500 pares de bases, existem sequências mais pequenas (com menos de 300 pares de bases) que correspondem a ADN de origem fetal. O ADNf tem origem quase exclusivamente placentária⁶ constituindo, em média, 5 a 10%⁵ da totalidade do ADN livre na circulação materna.

Apesar das células fetais intactas livres no sangue materno terem sido o substrato inicialmente estudado para efeitos de DPN não invasivo, a identificação do ADNf no sangue materno veio a revelar-se vantajosa. Ambos podem ser detetados na circulação materna desde a 5^a semana de gestação⁵, permitindo uma avaliação de risco várias semanas antes da que é dada pelos testes de rastreio correntes. No entanto, o ADNf encontra-se em maior concentração na circulação periférica, não requerendo técnicas especiais de isolamento e enriquecimento. Por outro lado evidencia, ao contrário das células fetais que permanecem anos em circulação, uma depuração completa do sangue materno em 2 a 3 horas após a dequitação⁵, impossibilitando resultados falsos positivos decorrentes da deteção de material genético oriundo de gestações anteriores.

Foi também já reconhecida a presença de mRNA fetal transcrito na circulação materna, com grande potencial no fornecimento de informações valiosas sobre a expressão génica fetal e saúde materna durante a gravidez⁴. No entanto, o ADN de origem fetal permanece como a pedra basilar dos avanços verificados em DPN não invasivo.

O ADNf livre no sangue materno pode ser analisado de forma qualitativa ou quantitativa.

A avaliação qualitativa procura detetar sequências

génicas com o intuito de identificar fetos portadores de determinada característica ou patologia.

A avaliação quantitativa permite determinar a concentração de ADNf e assim selecionar grávidas em risco de aneuploidias ou de certos eventos obstétricos desfavoráveis⁷. Esta pode ser feita fundamentalmente através de duas técnicas: MPS (*massively parallel sequencing*), que permite quantificar milhões de fragmentos de ADN, ou DANSR (*Digital ANalysis of Selected Regions*)^{1,8}. A DANSR identifica sequências específicas de ADNf de cromossomas selecionados através de oligonucleótidos *locus*-específicos que àqueles se ligam. Os oligonucleótidos hibridizados são depois amplificados por sondas PCR e sequenciados. Os resultados são analisados num algoritmo atendendo a dados maternos e gestacionais permitindo uma avaliação individualizada do risco. A grande vantagem desta técnica relativamente à sequenciação genómica completa é a redução substancial de material genético necessário. A grande desvantagem será a incapacidade de detetar outras anomalias cromossómicas que não as dos cromossomas em estudo⁹.

RASTREIO DE ANEUPLOIDIAS FETAIS

Potencialidades do ADNf

As potencialidades da análise do ADNf livre vão muito além do rastreio das aneuploidias fetais, tendo já dado provas na determinação do sexo fetal e do genótipo RhD fetal. Existem também resultados promissores na deteção de doenças fetais monogénicas¹⁰ e complicações obstétricas que envolvam perturbação da barreira placentária, como é o caso da pré-eclâmpsia⁷. Recentemente, foi ainda relatada a deteção não invasiva de deleções/duplicações dos cromossomas fetais¹¹, estando assim no horizonte a possibilidade de diagnóstico, sem risco materno-fetal associado, de diversas patologias genéticas hereditárias ou «de novo»^{12,13}. Todos estes avanços diagnósticos são fortemente impulsionadores de investimentos na área da terapia génica fetal, a qual começa a mostrar resultados entusiasmantes no caso da T21¹⁴.

No caso particular das aneuploidias fetais, o seu rastreio não invasivo assenta na análise quantitativa do ADNf. Verifica-se que, em gestações trissómicas, o ADN derivado do cromossoma extra resulta numa proporção de ADNf superior ao que seria espectável para uma gravidez com feto euploide⁸. É na capacidade de deteção deste pequeno aumento de material na circu-

lação materna que assenta o rastreio das aneuploidias. Esta capacidade de deteção está relacionada, por um lado, com o rigor técnico no tratamento da amostra de sangue materno e, por outro, com a proporção de ADNf, não dependendo da ocorrência de hemólise da amostra, história de hemorragia vaginal ou prevalência da doença na população¹⁵.

A concentração de ADNf no sangue materno é influenciada por diversos factores. Sabe-se, nomeadamente, que ela varia de forma direta com a idade gestacional (IG)¹⁶, tendo sido demonstrado um incremento abrupto nas últimas 8 semanas de gestação em resultado de uma provável alteração da barreira placentária⁷, com a massa placentária¹⁵ e o tabagismo¹⁷. Com o peso materno¹⁵ exibe uma relação inversa.

Sendo a fonte potencial do ADNf a apoptose de células trofoblásticas, será fácil entender a associação linear com a massa placentária e com a β -hCG e a PAPP-A⁸, metabólitos de produção placentária e, portanto, medidas indiretas daquela. Nas fumadoras, a explicação para um aumento do ADNf reside num aumento da necrose das células placentárias provocada pelo tabagismo¹⁷. A associação inversa com o peso materno parece resultar, sobretudo, de um efeito diluicional. Outra possível justificação apontada é o aumento do *turnover* dos adipócitos nestas mulheres, levando a maior quantidade de ADN materno libertado para a circulação resultando, assim, numa proporção inferior de ADNf. Uma nova colheita, efetuada 1-2 semanas mais tarde, consegue resolver esta questão em cerca de 60% dos casos^{18,19}.

Limitações do ADNf

Em cerca de 95% das situações consegue-se obter uma avaliação do risco de aneuploidias com base na análise quantitativa do ADNf. Em 1 a 5% dos casos não é possível obter um resultado do risco (falha técnica), maioritariamente por quantidade insuficiente de ADNf ou por limitações técnicas no processamento da amostra.

Como acontece com qualquer teste de rastreio e ao contrário dos métodos diagnósticos, esta avaliação está sujeita à ocorrência de FP e falsos negativos (FN).

Os FP (<1%) podem resultar de eventos da cadeia de custódia, de gravidez gemelar, doença metastática materna ou, principalmente, de mosaicismo placentar^{6,20,21}. O fenómeno de mosaicismo confinado à placenta atinge 4,8% no termo, pelo que é de prever, com a eventual futura generalização do rastreio não invasivo, um aumento do número de FP. Tal facto sugere ainda que perante um resultado positivo do rastreio não

invasivo, o melhor teste de *follow-up* seja a amniocentese e não a biopsia das vilosidades coriônicas²⁰.

Os FN são atribuíveis sobretudo a quantidade insuficiente de ADNf na amostra estudada. Às 11-13 semanas de gestação a fração fetal média de ADN livre no sangue materno é de 10%. Quando a fração de ADNf é inferior a 4%, o que pode suceder por diminuição do ADNf e/ou por aumento do ADN materno, a pequena diferença de ADN livre entre gestações euploides e triploides pode não ser detetável^{9,17}. O principal motivo para uma quantidade insuficiente de ADNf no sangue materno parece ser a obesidade materna¹⁵.

Validação clínica do ADNf

Apesar da possível ocorrência de resultados FP e FN, comuns a qualquer teste de rastreio, a análise do ADNf está atualmente validada como altamente sensível e específica no rastreio de T21 (Síndrome de Down), T18 (Síndrome de Edwards) e T13 (Síndrome de Patau).

Os ensaios clínicos iniciais, embora promissores, continham amostras reduzidas, tendo a sequenciação do ADN sido realizada em laboratórios não certificados e sem parâmetros técnicos reprodutíveis para a prática clínica¹⁹. Foram os trabalhos de *Palomaki*, *Bianchi*, *Norton* e *Ashoor* os grandes promotores da validação desta metodologia de rastreio das aneuploidias, conduzindo à sua aplicação clínica nos EUA, em gestações unifetais de risco elevado, nos finais de 2011²².

O primeiro grande trabalho de impacto científico sobre rastreio de aneuploidias fetais com base no ADNf foi liderado por *Palomaki*¹⁹. Num estudo multicêntrico caso-controlo de 2011, que incluiu 1971 grávidas de risco, das quais 283 apresentavam fetos com aneuploidias, *Palomaki* e col. alcançaram uma taxa de deteção para a T21 de 98,6%, com especificidade de 99,8%^{9,22}.

Trabalhos desenvolvidos posteriormente mostraram que para a T18 e sobretudo para a T13, a acuidade de deteção era inferior à verificada para a T21, quer a técnica de avaliação fosse MPS ou DANSR. Assim, num estudo prospetivo de *Norton* com 3228 grávidas, utilizando a metodologia DANSR, a sensibilidade para T18 foi de 97,4%, com especificidade de 99,9%. *Bianchi* num estudo prospetivo multicêntrico e *Palomaki*, num estudo multicêntrico caso-controlo, haviam reportado, com a tecnologia MPS, taxas de deteção para a T18 de 97,2 e 100%, respetivamente com especificidades de 100 e 99,7%^{9,22,23}. Para a T13, estes dois últimos autores alcançaram em 2012 taxas de deteção

de 78,6 e 91,7%^{9,22}. Igualmente para a T13, *Asboor*, em 2013, reportou num estudo caso-controlo com 2116 grávidas, utilizando a metodologia DANSR, uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 99,95%^{9,22}. Não obstante a amostra aneuplóide deste estudo ser pequena (n=10) e a IG destes fetos ser superior à dos controlos euploides (21 *versus* 13 semanas), o que se associa a frações fetais de ADN superiores (14 *versus* 10%), implicando, assim, vantagem técnica no sucesso da análise das amostras trissómicas, a taxa de FP foi muito reduzida, apenas 0,05%²⁴.

São várias as razões apontadas para que os métodos baseados na análise do ADNf livre na circulação materna demonstrem um desempenho inferior no rastreio pré-natal não invasivo das T18 e T13 comparativamente à T21. A que tem sido apontada como a principal é a menor quantidade relativa de citosina (C) e guanina (G) daqueles dois cromossomas, gerando um viés na sua sequenciação. No entanto, a menor incidência das trissomias 18 e 13 comparativamente à do cromossoma 21 torna, por si só, qualquer teste de rastreio menos fidedigno. Existe também, nos casos de T21 um aumento de 25% do ADNf comparativamente às gestações euploides, o que parece não suceder noutras trissomias constituindo, assim, uma vantagem técnica deste cromossoma para efeitos de acuidade do rastreio. Por último, há uma maior incidência de mosaïcismo confinado à placenta nas T13. Em gestações com T13, o mosaïcismo confinado à placenta tem maior número de células dissómicas do que acontece nos casos de T21, nos quais todas as células são invariavelmente trissómicas. Como a principal fonte do ADNf é a placenta, um mosaïcismo placentário maioritariamente dissómico conduz a um resultado falso negativo do rastreio não invasivo²⁴.

Globalmente, o impacto clínico desta redução de acuidade no rastreio da T18 e, sobretudo, no da T13, é muito reduzido. Tal deve-se principalmente às suas baixas incidências na população, mas também às elevadas prevalências associadas de morte intra-uterina e de malformações estruturais *major*, as quais, se detetáveis ecograficamente, levam inevitavelmente à realização de um teste diagnóstico.

Todos os estudos que validaram a aplicabilidade clínica do ADNf no rastreio de aneuploidias fetais foram realizados em gestações unifetais de risco elevado para aneuploidias. No entanto, *Nicolaidis* e col., em 2012, procuraram avaliar a sua validade para a população geral. Numa população não selecionada de 1949 grávidas, alcançaram taxas de deteção de 100% para T21 e de

66% para T18, com especificidades de 99,9%²⁵. Com estes resultados defenderam a possibilidade de alargamento para a população geral das conclusões obtidas nos estudos realizados em populações de risco. No caso das gestações múltiplas foram também já publicados 3 estudos de séries de casos (*Sehnert*, 2011; *Lau*, 2012; *Canick*, 2012), os quais incluíram, no entanto, amostras muito reduzidas (todas inferiores a 30 casos)⁹. Aguardam-se resultados de estudos mais alargados nestas populações para poder concluir acerca da possibilidade da universalização populacional do rastreio não invasivo baseado na análise do ADNf.

ADNf *versus* metodologias convencionais

A principal vantagem desta metodologia de rastreio comparativamente aos métodos convencionais reside na substancial redução dos FP (<1%). Esta pequena, mas clinicamente relevante, taxa de FP impede a sua classificação como teste de diagnóstico^{9,26}, pelo que não será de esperar um abandono completo das técnicas invasivas.

Prevê-se que a generalização do rastreio não invasivo resulte numa redução em 98%⁵ do número de procedimentos diagnósticos. Em consequência, verificar-se-á também uma redução dos eventos obstétricos adversos associados às técnicas e dos gastos do sistema de saúde⁵. O estudo MELISSA estimou que a inclusão do ADNf como teste de rastreio na população de alto risco reduziria em 66% o número de abortamentos relacionados com técnicas de diagnóstico, conduzindo a um aumento de 38% dos casos de T21 diagnosticados em fase pré-natal e com redução em 1%/ano dos custos em diagnóstico e rastreio pré-natal¹. A apresentação do rastreio como «risco elevado» ou «risco reduzido» constituirá outra das suas vantagens¹⁸, na medida em que promove uma melhor compreensão dos resultados e deste modo, uma mais fácil decisão parental. De todas as suas vantagens, a mais valorizada pelas grávidas parece ser a ausência de risco fetal, reforçando a noção de que o aconselhamento é parte essencial do rastreio pré-natal²⁷. As recomendações actuais das sociedades de DPN/Genética e Obstetrícia são de que exista um aconselhamento pré e pós-teste visando os principais objetivos e limitações, implicando a sua realização uma prescrição médica obrigatória após o esclarecimento do casal.

No que respeita às desvantagens, o elevado custo e o tempo de espera entre a colheita de sangue materno e a obtenção dos resultados (8 a 10 dias) são os principais inconvenientes apontados. A questão dos custos

tem sido o grande obstáculo à oferta pelos serviços de saúde públicos deste tipo de rastreio. Quanto ao período de espera até à obtenção dos resultados, este tem sido apontado como demasiado longo, podendo resultar numa eventual inviabilização de obtenção de um rastreio do primeiro trimestre. Em caso de falha técnica (o que acontece em 1-5% dos casos), dependendo da idade gestacional à data da colheita, pode ser ultrapassada a IG recomendada para a realização do rastreio convencional do primeiro trimestre.

Aplicabilidade clínica

O rastreio não invasivo está disponível na América, Ásia, Médio Oriente e Europa. Na Europa e nomeadamente em Portugal, as amostras de sangue materno são congeladas e enviadas para os EUA, onde é feito o seu processamento laboratorial. São 4 as principais companhias a oferecer DPN não invasivo nos EUA. Atualmente, todos os testes disponíveis no mercado (*Materni 21 Plus*[®], *Verifi*[®], *Harmony Prenatal Test*[®] e *Panorama Prenatal Test*[®]) contemplam uma avaliação do risco das três trissomias autossómicas mais frequentes após as 10 semanas de gestação (*Panorama Prenatal Test*[®] desde as 9 semanas) e, à exceção do *Harmony Prenatal Test*[®], das aneuploidias dos cromossomas sexuais. Os resultados estão disponíveis em 8 a 10 dias após a colheita do sangue materno (15 dias no caso do *Panorama Prenatal Test*[®]), a preços entre 495 dólares (*Verifi*[®]) e 1700 dólares (*Materni 21*[®]). Não existem estudos comparativos dos testes das diferentes empresas, mas estas reportam sensibilidades e especificidades semelhantes²⁸.

As atuais recomendações da Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-natal (ISPD), da Sociedade Americana de Aconselhamento Genético (NSGC) e do Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia (ACOG) aconselham realizar a análise do ADNf livre na circulação materna após as 10 semanas de gestação permitindo, assim, manter as potenciais vantagens do rastreio convencional às 12 semanas¹⁸ e classificam-no como um teste de rastreio altamente eficaz para a população de risco. Não obstante a elevada acuidade do teste de ADNf, esta avaliação não substitui ainda na atualidade as metodologias invasivas de diagnóstico, nem anula a ecografia do primeiro trimestre, esta última com vantagens inequívocas no diagnóstico precoce de algumas anomalias fetais.

Previamente à colheita de sangue materno para o rastreio não invasivo, a grávida deverá realizar uma ecografia obstétrica com intuito de confirmar viabilidade,

idade gestacional e excluir malformações ou gestação múltipla.

*Gil e col.*¹⁸, num estudo que procurou avaliar a viabilidade de implementação sistemática do rastreio baseado na análise do ADNf, realizaram esta avaliação ecográfica prévia às 10 semanas de gestação. Nesta mesma data, cada grávida efetuou a colheita de sangue para o rastreio bioquímico convencional e para a análise do ADNf, cujos resultados estavam disponíveis à data da avaliação ecográfica do primeiro trimestre, realizada às 12 semanas de IG. A colheita do sangue materno para o ADNf às 10 semanas, seguida de ecografia obstétrica do 1º trimestre às 12 semanas parece permitir uma boa relação entre as vantagens e limitações do rastreio não invasivo e, portanto, um eficaz aconselhamento pré-natal.

Perante um qualquer resultado positivo do rastreio, deverá ser oferecida a realização de um teste invasivo confirmatório. Atendendo à prevalência de cada uma destas trissomias na população, estima-se que um resultado positivo para T21 implica um aumento deste risco em cerca de 490 vezes, enquanto um teste negativo, uma redução do risco basal de 72 vezes¹⁹; um resultado positivo para T13 implica um aumento do risco em 1600 vezes; se o resultado do rastreio é negativo, há uma diminuição em 5 vezes do risco *a priori*²⁴. Se o teste indicar baixo risco para T21 ou T18, o resultado deverá ser encarado como altamente fidedigno¹⁸. Para a T13, se o risco dado pela análise do ADNf é baixo mas o rastreio combinado dá um risco elevado, o casal deverá ser aconselhado a realizar um teste diagnóstico¹⁸.

Caso a ecografia do 1º trimestre evidencie uma translucência nucal aumentada (superior ao p95 para a IG) ou malformação fetal *major* estará indicada a realização de um procedimento invasivo independentemente do resultado do rastreio não invasivo pois, nestes casos, estas trissomias são responsáveis por apenas 75-80% das aneuploidias clinicamente associadas.

Na incapacidade de obtenção de qualquer resultado (falha técnica), a avaliação do risco deverá basear-se nas metodologias convencionais.

Em suma, atualmente, o rastreio não invasivo baseado na análise do ADNf está apenas validado para gestações unifetais de alto risco e integrado em aconselhamento pré-natal. Existem duas opções: usá-lo como abordagem inicial do risco de aneuploidia ou após a realização de uma metodologia de rastreio convencional, situação em que é denominado de rastreio «avançado»^{1,29,30}. Ele não anula nem a ecografia do pri-

meiro trimestre, cujas potencialidades diagnósticas e preditivas excedem, em muito, o rastreio de aneuploidias fetais, nem as metodologias invasivas tradicionais.

Apesar do inquestionável valor e potencial do rastreio e diagnóstico pré-natal não invasivo, as clássicas questões éticas³¹ que envolvem o acesso ao genoma fetal não deverão ser esquecidas, nomeadamente no que respeita à propriedade da informação, acesso e proteção dos dados. Não será também de ignorar a eventual criação de uma janela temporal de oportunidade para a seleção do sexo fetal, função da conjugação da possibilidade de determinação não invasiva do sexo fetal a partir das 7 semanas de idade gestacional, com a permissividade da interrupção voluntária da gravidez até às 10 semanas.

CONCLUSÕES

Os estudos de *Palomaki, Bianchi, Norton e Ashoor*, realizados em populações de risco, permitiram validar a MPS e a DANSR como metodologias de análise do ADNf livre no sangue materno, possibilitando uma avaliação não invasiva e altamente sensível e específica do risco de aneuploidias fetais. *Nicolaides* e col. mostraram resultados semelhantes na população geral, prevendo-se que, em breve, este seja um método de rastreio universal em todas as gestações unifetais. O principal fator limitativo continua a ser o custo associado.

Os dados actuais sustentam, por enquanto, o seu lugar como teste a aplicar apenas na população de risco (> 35 anos; rastreio bioquímico ou ecográfico positivo; filho anterior com cromossomopatia; progenitores portadores de translocação robertsoniana com risco aumentado para T21). Atualmente, o rastreio não invasivo de aneuploidias apenas informa acerca do risco para T21, 18 e 13, pelo que não poderá substituir em absoluto os métodos de rastreio e diagnóstico pré-natal convencionais²⁹. O aconselhamento deverá reforçar a noção de que um resultado negativo não é garantia de uma gravidez não afetada, pois falsos negativos podem ocorrer. A oferta de testes diagnósticos invasivos deverá manter-se para gestações com resultados positivos no rastreio^{29,30}, bem como para aquelas cujos fetos apresentem, apesar de um rastreio negativo, translucência da nuca aumentada ou malformações estruturais na ecografia do 1º trimestre. A análise do ADNf parece ser, assim, um valioso método de rastreio, não substitutivo, mas complementar da avaliação ecográfica do 1º trimestre^{15,24}.

É de prever, conforme indicam estudos preliminares, o alargamento da sua validade à população geral, bem como uma maior acuidade na deteção de outras anomalias cromossómicas e doenças monogénicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Walsh JME, Goldberg JD. Fetal aneuploidy maternal plasma DNA technology assessment. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 514-520
- Chetty S et al. NIPT uptake in PNS positive women. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 542-546
- Mersy et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. *Human Reproduction Update*, 2013, Vol 0, 1-12
- Miranda Lopes APB, Brandão A, Ferreira AC, Malta F, Pardini VC, Cabral AC. Diagnóstico pré-natal utilizando material fetal isolado do sangue periférico materno. *FEMINA*, Ago 2009, (37) nº8: 423-426
- Homem Melo Marques S. ADN fetal livre no sangue materno e diagnóstico pré-natal não invasivo - uma realidade. *Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa*, Set 2012, vol6 (3):133-139
- Pan M et al. Discordant results between fetal karyotyping and non-invasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 598-601
- Coutinho CM, Donabela FC, Ramos ES, Duarte G. Diagnóstico pré-natal utilizando sangue materno. *FEMINA*, Jul 2009, (37) nº7: 357-360
- Nicolaides KH et al. Validation study of cfDNA testing using SNPs. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 575-579
- Hui L., Opinion. Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidy: charting the course from clinical validity to clinical utility. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 2-6
- Lench N. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 555-562
- Chen S et al. Detection of large (>10 Mb) fetal deletions/duplications for low coverage massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 584-590
- Snyder MW et al. Noninvasive fetal genome sequencing: a primer. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 547-554
- Boon EMJ, Faas BHW. Whole genome versus targeted approaches for NIPT. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 563-568
- Guedj F, Bianchi DW. Noninvasive prenatal testing creates an opportunity for antenatal treatment of Down syndrome. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 614-618
- Ashoor et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41:26-32
- Nicolaides KH et al. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first trimester population. *Am J Obstet Gynecol*, 2012; 207:374.e1-6
- Chitty LS, Bianchi DW. Noninvasive Prenatal testing: the paradigm is shifting rapidly. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 511-513
- M.M.Gil. Implementation of maternal blood cfDNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42:34-40
- Palomaki et al, DNA sequencing of maternal plasma to de-

tect Down Syndrome: an international clinical validation study, *Genetics in Medicine*, 2011, Vol. 13, N11

20. Mazloom AR et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosome aneuploidies by MPS. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 591-597

21. Lau TK et al. Secondary findings from NIPT for common fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 602-608

22. Devers et al. NSGC Noninvasive Prenatal Testing Position Statement, 2013, *J Genet Counsel*

23. Palomaki et al, Detecting common aneuploidies in maternal plasma, *Genetics in Medicine*, 2012, Vol. 14, N3

24. G. Ashoor. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method, *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41:21-25

25. Fairbrother G et al. Clinical experience of NIPT with cell-free DNA for fetal trisomies 21,18 and 13 in a general screening population. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 580-583

26. Evans MI, Kilpatrick M. Noninvasive Prenatal Diagnosis: 2010. *Clin Lab Med* 30 (2010) 655-665

27. HILL et al. Women's and health professionals' preferences for prenatal tests for Down syndrome: a discrete choice experiment to contrast noninvasive prenatal diagnosis with current invasive tests. *Genetics in Medicine*, Nov 2012, Vol 14, n°11, 905-913

28. Agarwal a et al. Commercialization of non-invasive prenatal testing in the United States. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 521-531

29. Committee Opinion. Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Aneuploidy. *Obstetrics & Gynecology*, Dec 2012, Vol 120, n°6, 1532-1534

30. Bianchi et al. Genome-Wide Fetal Aneuploidy Detection by Maternal Plasma DNA Sequencing. *Obstetrics & Gynecology*, May 2012, Vol 119, n°5, 890-901

31. Skirton H, Patch C. NIPT review. Factors affecting the clinical use of non-invasive prenatal testing: a mixed methods systematic review. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33, 532-541