



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA ISABEL DA SILVA MARTINHO

ADN fetal livre no sangue materno
e
rastreio de aneuploidia fetal

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE OBSTETRÍCIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
DRA HELENA RAQUEL ARANTES RODRIGUES CORTE REAL GONÇALVES
PROFESSOR DOUTOR JOSÉ JOAQUIM DE SOUSA BARROS

JANEIRO/2017

RESUMO

O rastreio pré-natal de aneuploidias tem o objetivo de avaliar qual o risco que uma mulher grávida apresenta de ter um feto com anomalias cromossômicas. O rastreio de aneuploidias é amplamente oferecido às mulheres, existindo diferentes abordagens com vantagens, desvantagens e diferentes capacidades de detecção. Mais recentemente surgiu um novo teste de rastreio (enfoque deste trabalho) que promete revolucionar o rastreio pré-natal como até agora o conhecemos. O designado teste de rastreio pré-natal não invasivo (TPNNI) usa o ADN fetal livre presente na circulação materna, tendo sido validado por diferentes estudos e apresentando uma elevada taxa de detecção, alta especificidade e baixo número de falsos positivos e negativos. O TPNNI não é um teste diagnóstico e, por isso, não deve substituir os testes diagnósticos como a amniocentese ou a biópsia das vilosidades coriônicas. Em raros casos, e por questões técnicas ou biológicas, não é capaz de reportar um resultado, designados os "*no calls*", que constituem uma das lacunas deste teste. Atualmente ainda é um teste dispendioso e que deve ser aplicado apenas na gravidez unifetal e numa abordagem secundária, acompanhado de um aconselhamento eficaz pré-teste e pós-teste. A aplicação do ADN fetal livre no contexto do diagnóstico pré-natal teve início com a determinação do sexo fetal e da determinação do fator Rh fetal, estendendo-se posteriormente ao rastreio de aneuploidias e mais recentemente têm sido desenvolvidos esforços para que possa ser estendido a outras patologias com origem cromossômica, no entanto estas investigações recentes carecem ainda de validação científica.

Palavras-chave: Rastreio; Aneuploidias; Não invasivo; DNA fetal; Sangue materno

ABSTRACT

The purpose of prenatal screening for aneuploidy is to provide an assessment of the woman's risk of carrying a fetus with chromosomal abnormalities. The screening for aneuploidies is widely offered to women and there are a variety of screening test options, each offering different levels of advantages, disadvantages and accuracy. More recently, a new screening test (focus of this work) has emerged that promises to revolutionize prenatal screening as we know it so far. The so-called noninvasive prenatal screening test (NIPT) uses free fetal DNA present in the maternal circulation and has been validated by several studies which report a high detection rate, high specificity and low false positive and negative rates. NIPT is not a diagnostic test and, therefore, should not replace diagnostic tests as amniocentesis or chorionic villus biopsy. In rare cases, and for technical or biological reasons, NIPT is not able to report a result, called "no calls", which are one of the gaps in this test. Nowadays it is still an expensive test that should be applied only in singleton pregnancies as a secondary approach and with an effective pre-test and post-test counseling. The implementation of free fetal DNA in the context of prenatal diagnosis began with the determination of fetal sex and determination of fetal Rh factor, being later extended to the screening of aneuploidies. More recently efforts have been made so that it can be extended to other disorders with chromosomal origin, however these recent investigations still need validation.

Key words: Screening; Aneuploidies; Non-invasive; Fetal DNA; Maternal blood

ÍNDICE

RESUMO	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	3
3. DISCUSSÃO	5
3.1. Rastreamento de Aneuploidias.....	5
3.2. Métodos de Rastreamento.....	6
3.3. Contexto Histórico.....	11
3.4. ADN fetal livre.....	13
3.5. Testes pré-natais não invasivos	15
3.5.1 Tecnologias vigentes	16
3.5.2 Performance no rastreamento de aneuploidias	18
3.5.3 Falsos positivos, falsos negativos e resultados discordantes	21
3.5.4 "No calls"	24
3.5.5 Métodos para implementação clínica	26
3.5.6 Aconselhamento genético	29
3.5.7 Resultado TPNNI positivo - e depois?	31
3.5.8 Custo-efetividade	32
3.5.9 Controvérsias	33
3.5.10 Impacto real do uso de TPNNI	35
3.5.11 Experiência europeia com TPNNI	40
3.5.12 Pareceres e Opiniões das distintas sociedades científicas	42
3.5.13 Aplicações Futuras dos testes cfDNA	46
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE SIGLAS

ACOG	Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFP	Alfa Feto Proteína
BVC	Biópsia das Vilosidades Coriônicas
cfDNA	ADN livre
DNA	Deoxyribonucleic acid
E	Especificidade
FF	Fração Fetal
FP	Falsos Positivos
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana
IMC	Índice de Massa Corporal
MPS	Massively Parallel Sequencing
NIPT	Noninvasive Prenatal Screening Test
P	Percentil
PAPP-A	Proteína Plasmática associada à Gravidez
PIGF	Fator de Crescimento Placentário Plasmático
RC1T	Rastreio Combinado do primeiro Trimestre
RCOG	Colégio Inglês de Obstetras e Ginecologistas
RPNNI	Rastreio Pré-Natal Não Invasivo
S	Sensibilidade
SMFM	Sociedade de Medicina Materno-Fetal
s-MPS	Shotgun - Massively Parallel Sequencing
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOGC	Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Canadá
t-MPS	Targeted - Massively Parallel Sequencing
TN	Translucência da Nuca
TPNNI	Teste Pré-Natal Não Invasivo
uC	Unidades de Custo de um teste combinado
uE3	Estriol não conjugado
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE FIGURAS

1. Interfase celular fetal isolada por fluorescência com origem no sangue materno.....11
2. Efeito da idade gestacional na fração fetal.....14
3. Massively parallel shotgun (MPS) na detecção pré-natal não invasiva de aneuploidia fetal.....17
4. Amniocentese (A) e BVC (B) antes da introdução do rastreio combinado do primeiro trimestre em 2006 e teste pré-natal não invasivo em 2012.....38
5. A importância da prevalência populacional no valor preditivo de um teste de rastreio: ilustração com ADN fetal livre.....45

1. INTRODUÇÃO

O rastreio pré-natal de aneuploidia fetal é oferecido, atualmente e desde há décadas, a todas as mulheres grávidas (através do rastreio do primeiro trimestre em que se combinam os marcadores ecográficos e bioquímicos do soro materno, e/ou com o rastreio do segundo trimestre, recorrendo também neste caso a doseamentos hormonais no soro materno) que, associado à idade materna, história prévia de aneuploidias, entre outros marcadores, permitem o cálculo do risco individual de aneuploidia para cada gestação. Face a um rastreio positivo, isto é, indicativo de um risco elevado de aneuploidia, é oferecido à mulher a possibilidade de se submeter a um teste diagnóstico, que por ser invasivo, acarreta risco de perda fetal (0,5-1%). Então, desde há muito tempo que existe o desejo e a necessidade de encontrar métodos alternativos, não invasivos, capazes de responder às necessidades das gestantes e dos casais.

O teste pré-natal não invasivo (TPNNI) é o desenvolvimento mais recente e revolucionário que, usando ADN fetal livre em circulação no sangue materno, promete modificar a abordagem do rastreio como até agora o conhecemos. A pesquisa de ADN fetal livre no sangue materno é acessível através de uma simples venopunção, apresentando elevadas taxas de deteção de aneuploidia fetal, com taxas de falsos positivos francamente inferiores aos métodos atualmente implementados.

Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma revisão bibliográfica nesta área, analisar o contexto histórico e conhecer o que foi desenvolvido até à data. Saber como se usa esta nova metodologia, reconhecer quais as suas falhas e fatores de confundimento e, mais importante, avaliar a sua aplicabilidade no rastreio de aneuploidias de forma sistemática no Sistema Nacional de Saúde.

Este estudo incide no rastreio das aneuploidias mais frequentes como as trissomias 21, 18 e 13, com maior incidência na trissomia 21 e em gestações unifetais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa da literatura foi realizada através da base de dados PubMed, com restrição a publicações escritas em inglês. O período de pesquisa foi desde 1969 a 2016, tendo sido excluídas publicações realizadas entre 2000 e 2012 para que o número de referências bibliográficas fosse o exigido pelas normas deste trabalho. A lista de publicações foi gerada através da pesquisa dos termos: "screening", "aneuploidies", "non-invasive", "fetal DNA" e "maternal blood". A escolha das publicações foi obtida através da análise dos resumos, para que fossem identificados os artigos mais relevantes.

3. DISCUSSÃO

3.1 Rastreo de Aneuploidias

O rastreo pré-natal de aneuploidias deve ser oferecido a todas as grávidas com o objetivo de determinar qual o risco que cada uma tem de ser portadora de um feto com anomalias cromossômicas. Existe uma variedade de opções possíveis, cada uma com diferentes níveis de eficácia, vantagens e desvantagens que devem ser explicadas à mulher e ao casal, de tal modo, que estes possam realizar uma escolha informada e que vá de encontro às suas circunstâncias e interesses.¹

Um teste de rastreo pré-natal tem como objetivo avaliar se a gestante tem um risco aumentado de ter um feto com uma determinada anomalia, que difere de um teste diagnóstico que pretende determinar, com a máxima certeza possível, se o feto apresenta a anomalia especificamente pesquisada.¹ É recomendado que testes de rastreo e diagnóstico de aneuploidias devam ser oferecidos a todas as grávidas precocemente na gravidez, e idealmente, no primeiro trimestre.

Uma aneuploidia é definida como a existência de um número alterado de cromossomas, levando a um desequilíbrio de ADN nas células e, conseqüentemente anomalias funcionais e estruturais no feto. As anomalias cromossômicas ocorrem, aproximadamente em 1 em cada 150 fetos vivos.¹ As trissomias dos autossomas são as anomalias mais frequentes, e destas a mais prevalente é o Síndrome de Down (trissomia 21), ocorrendo 1 em cada 500-1000 fetos vivos; a trissomia 18 e a trissomia 13 são a segunda e terceira aneuploidias mais frequentes, respectivamente.²

3.2 Métodos de Rastreio

Os testes de rastreio, em geral, estratificam as mulheres em grupos individuais: (1) aquelas que apresentam um teste de rastreio positivo (ou seja com risco elevado, superior ao ponto de corte previamente estabelecido), e portanto, com um risco aumentado de possuir um feto aneuploide e (2) aquelas em que o teste de rastreio é negativo (risco menor ao ponto de corte previamente estabelecido), e conseqüentemente com um risco de aneuploidias reduzido. Às mulheres com rastreio positivo deve ser oferecido a oportunidade de realizar um teste diagnóstico. Às mulheres com rastreio negativo também deve ser oferecido aconselhamento apesar do risco de aneuploidia ser menor, uma vez que o teste de rastreio negativo não exclui por completo a ocorrência de um feto aneuploide. A estas mulheres (teste negativo) não deve ser dada a oportunidade de realizar testes de rastreio adicionais porque tal aumenta o potencial de falsos positivos. No entanto, esta situação não exclui, que com o avançar da gravidez, esta possa ser alvo de testes diagnósticos, particularmente se dados adicionais se tornarem evidentes (como a identificação de anomalias fetais ou marcadores de aneuploidia à ecografia).¹

Atualmente estão disponíveis testes de rastreio de aneuploidias no 1º e 2º trimestres. No primeiro trimestre (ecográfico, bioquímico e combinado), bioquímico no segundo trimestre (triplo, quádruplo, quádruplo) e rastreio ecográfico. As diferentes opções contempladas podem ser complementadas por uma abordagem através do TPNNI, método de rastreio alvo de discussão neste trabalho.

1. Rastreio do Primeiro Trimestre

Realizado caracteristicamente entre as 8 semanas e as 13 semanas e 6 dias de gestação, inclui a medição ecográfica da translucência da nuca (11 semanas-13 semanas e 6 dias), e o doseamento sérico da gonadotrofina coriônica humana (hCG) -fração livre β ou total-, e a

proteína plasmática associada à gravidez (PAPP-A). O risco estimado de aneuploidia é calculado através destes dados e de fatores maternos como a idade materna, história prévia de aneuploidia, peso, raça e número de fetos.

A translucência da nuca (TN) é avaliada ecograficamente e corresponde ao espaço preenchido por fluido na região dorsal do pescoço fetal. Um aumento da TN (acima do percentil 95 (P95) relativamente ao comprimento céfalo-caudal) está associado, de forma independente, a um risco de aneuploidia fetal e anomalias estruturais, e quanto maior a TN maior o risco de coexistir uma gravidez afetada (relação proporcional).

Esta abordagem de rastreio tem uma taxa de deteção de Trissomia 21 de 82-87%, com cerca de 5% de falsos positivos. Tem como vantagens o fato de ser um rastreio realizado precocemente na gravidez, único, e com recurso a marcadores bioquímicos (hCG e PAPP-A) e ecográficos (TN, osso nasal, ducto venoso, tricúspide), capazes de rastrear outros resultados adversos da gravidez. A principal desvantagem que apresenta está relacionada com o fato de ter taxas de deteção inferiores às dos testes combinados do 1º e 2º trimestres, como mais à frente se demonstrará.

2. Rastreio Quádruplo

O rastreio quádruplo pode ser efetuado entre as 15 semanas e as 22 semanas e 6 dias, ou seja, durante o segundo trimestre. Não faz uso da medição da TN e por isso não é necessária a ecografia fetal. É um rastreio que também fornece informação sobre o risco para outros defeitos fetais além do risco de aneuploidias, como as doenças do tubo neural. A melhor janela de oportunidade para ser realizado é entre a 16ª e a 18ª semanas, período que otimiza o rastreio dos defeitos do tubo neural.

Os quatro analitos maternos mensurados são a hCG, a alfa fetoproteína (AFP), a inibina-A dimérica e o estriol não conjugado (uE3) combinados com fatores maternos como a idade, raça, presença de Diabetes e o número fetos, para alcançar um risco estimado.

Esta abordagem de rastreio tem uma taxa de detecção inferior ao rastreio do primeiro trimestre, com cerca de 81%, com taxas de falsos positivos em cerca de 5%. As vantagens estão relacionadas com o facto de ser um teste único, independente de um técnico especializado em ecografia, avaliando também os defeitos do tubo neural, sendo os analitos doseados capazes de avaliar outros defeitos fetais. A sua grande desvantagem é a mesma do rastreio anterior: taxas de detecção inferiores às das abordagens combinadas.

Quer no rastreio do primeiro trimestre quer no agora abordado é importante que a datação da gravidez esteja bem estabelecida aquando a colheita das amostras sanguíneas para análise, isto porque uma datação incorreta diminui a precisão dos testes.

3. Rastreio Quíntuplo

O rastreio quádruplo não é nada mais do que o rastreio quádruplo com mais um marcador plasmático: a hCG hiperglicosilada (também conhecida como antigénio trofoblástico invasivo), realizando-se também no mesmo período de tempo. Existe um ensaio retrospectivo que afirma uma ligeira melhoria na performance do rastreio do segundo trimestre, com esta metodologia, no entanto esta abordagem é pouco usada e não há ensaios comparativos desta metodologia com as outras vigentes.

4. Rastreio Triplo

Os três marcadores avaliados para determinar o risco de aneuploidias são a hCG, a AFP e o estriol não conjugado. É de todos os tipos de rastreio apresentados o que possui menor taxa de detecção do Síndrome de Down com apenas 69%.

5. Rastreio Combinado do 1º e 2º trimestres

O rastreio combinado do primeiro e segundo trimestres é o protocolo que apresenta melhores taxas de detecção comparativamente aos rastreios únicos. Inclui três abordagens combinadas: integrada, sequencial e por fim o contingente. Dependendo da abordagem

escolhida o resultado do teste de rastreio pode estar disponível ainda no primeiro trimestre ou apenas no segundo.

Integrado: ao realizar o rastreio integrado a utente realiza a medição da TN, os analitos e ainda o rastreio quádruplo do 2º trimestre, culminando num só resultado disponível apenas no segundo trimestre. Caso os dados ecográficos não estejam disponíveis quer por questões técnicas quer fetais, pode-se oferecer à grávida um teste integrado apenas analítico, excluindo a TN. Esta abordagem integrada exclusivamente analítica apresenta taxas de deteções inferiores ao rastreio integrado (88% vs 96%). A grande desvantagem deste rastreio é a necessidade de duas amostras temporalmente distantes e dependentes uma da outra para a obtenção de um resultado final.

Sequencial: O rastreio sequencial foi desenvolvido na tentativa de colmatar a desvantagem da abordagem integrada mantendo a alta taxa de deteção do mesmo. Assim, o rastreio sequencial aborda de forma combinada o rastreio do 1º e 2º trimestres mas é capaz de reportar um resultado, ou seja, uma estratificação do risco no primeiro trimestre. Esta diferença permite à grávida tomar decisões mais precocemente caso o teste preliminar do primeiro trimestre revele um alto risco para aneuploidia. Caso tal aconteça é oferecido à mulher a possibilidade de realizar um teste diagnóstico ou até mesmo a pesquisa de ADN fetal livre no sangue materno (o enfoque deste trabalho), sendo o protocolo do segundo trimestre automaticamente descontinuado. Se o risco de aneuploidia for negativo no 1º trimestre, proceder-se-á ao rastreio do segundo trimestre como contemplado no protocolo. As taxas de deteção do rastreio sequencial são de 91-93%.

Contingente: Este modelo estratifica o risco da grávida de apresentar aneuploidias em 3 níveis: alto, intermédio e baixo com base no resultado do rastreio do primeiro trimestre. As mulheres classificadas como sendo de alto risco têm a oportunidade de realizar o rastreio de ADN fetal livre ou proceder a um teste invasivo - biópsia das vilosidades coriónicas (BVC) -,

àquelas que apresentam um risco baixo não é recomendado qualquer tipo de teste ou rastreio adicional. Por fim, apenas às mulheres que possuem um risco intermédio é oferecida a possibilidade de realizar um rastreio do segundo trimestre, deste modo um menor número de mulheres necessitam de se sujeitar ao rastreio do 2º trimestre. Teoricamente este protocolo permite manter as altas taxas de deteção (88-94%) com baixo número de falsos positivos enquanto reduz o número de rastreios do 2º trimestre.

O uso de múltiplos rastreios de forma independente não é aconselhado porque resultaria num elevado número de testes de rastreio positivos, resultando em riscos estimados confusos para as grávidas.

6. Rastreio Ecográfico no 2º trimestre

Embora os fetos afetados com trissomia 13 ou 18 apresentem habitualmente anomalias estruturais major facilmente evidenciadas pela ecografia, a identificação ecográfica do Síndrome de Down é mais desafiante. No entanto, existem marcadores ecográficos, major e minor, associados à trissomia 21, são considerados marcadores major, entre outros os defeitos cardíacos (anomalias do septo, tetralogia de Fallot e defeito do canal auriculoventricular), a atresia duodenal, osso nasal hipoplásico ou prega da nuca aumentada, tipicamente identificados no segundo e terceiro trimestres. Os marcadores minor são menos específicos mas mais comuns nos fetos portadores de Síndrome de Down, podendo fazer suspeitar de anomalias fetais, são exemplos a prega da nuca aumentada, a dilatação da pélvis renal, o intestino hiperecogénico, ossos longos curtos. Dada a inespecificidade destes últimos marcadores, estes podem estar presentes em fetos ditos normais (sem anomalia cromossómica) o que dificulta a distinção entre gravidezes afetadas e normais. Grávidas portadoras de fetos com as anomalias referidas beneficiam de seguimento com indicação para realização detalhada da ecografia e correção do risco inerente ao marcador/marcadores identificados.

3.3 Contexto Histórico

Em 1969, foi reportado (Walknowska *et al.*)³, pela primeira vez, a capacidade de recuperar e identificar células fetais provenientes do sangue materno. Recorrendo à detecção de metafases do cromossoma Y, em mulheres grávidas de fetos do sexo masculino, foi possível comprovar a existência de células de origem fetal na circulação materna, constituindo uma potencial fonte para o rastreo de aneuploidias, através de uma abordagem não invasiva e possível logo durante o primeiro trimestre. Apesar das grandes expectativas, era unânime a consciência de que essas descobertas constituíam apenas o primeiro passo na revolução do rastreo pré-natal e que eram necessárias mais investigações de forma a aumentar as taxas de detecção dessas células, uma vez que era evidente a escassez das mesmas. A proporção de células fetais existentes em relação com as células totais na amostra sanguínea era de apenas 0,14-1,5%.^{4,5}

Apesar da grande expectativa inicial relacionada com as descobertas de Walknowska *et al.*, apenas dez anos depois, em 1979, com um estudo liderado por Herzenberg *et al.*⁶ é que foi reportado o enriquecimento das células portadoras do cromossoma Y através de técnicas capazes de aumentar a detecção celular fetal (Figura 1).

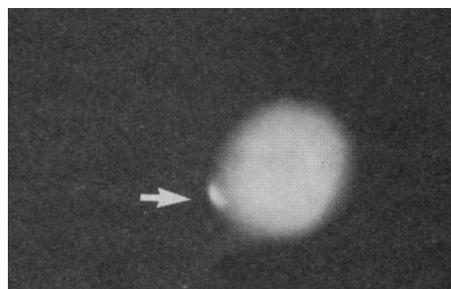


Figura 1. Interfase celular fetal isolada por fluorescência com origem no sangue materno. Seta indica cromatina Y. *Adaptado de Herzenber LA, et al. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting (1979).*⁶

Ao longo dos anos seguintes foram muitos os estudos que se revelaram decepcionantes na obtenção do cariótipo fetal por este método e, após um período de inatividade, Bianchi *et al.*⁷, em 1990, identificou e recuperou eritrócitos nucleados fetais. E, com sucesso, detetou o sexo fetal (em 75% dos casos), através do estudo genético, demonstrando assim que era possível isolar sequências de genes a partir de uma amostra de sangue materno. Provou-se que 1 em cada 10^7 células no sangue materno eram de origem fetal.^{7,8}

Com o objetivo de aprimorar a técnica, foram estudadas diferentes células capazes de atravessar a placenta e alcançar a circulação materna. De entre trofoblastos, linfócitos e granulócitos, as que revelaram maior potencial foram os eritroblastos (glóbulos vermelhos nucleados). Os eritroblastos existem em elevada frequência na circulação materna e desde um estadio precoce da gravidez, são bem diferenciados e apresentam um tempo de semivida relativamente curto⁹, para além de, não ser expectável que estejam presentes no sangue periférico de um adulto⁷, reunindo assim condições que permitem ser a célula eleita.

Em termos tecnológicos, também se realizaram inúmeras investigações¹⁰⁻¹⁴ sobre como detetar, enriquecer e amplificar o material genético das células. Posteriormente a estas, surgiram estudos com taxas de deteção de trissomia 21 bastante apelativas: com sensibilidade de 97% e uma taxa de falsos positivos de 13%.⁸

No entanto, e apesar do esforço em aprimorar a metodologia, que se revelou demorada, dispendiosa, com rendimentos baixos e inconsistentes na obtenção das células fetais, esta acabou por ser, progressivamente, abandonada. Assim sendo, sucessivos estudos surgiram com o intuito de obter material genético fetal de um modo alternativo mas igualmente não invasivo.^{15,16}

A mudança de estratégia ocorreu após os trabalhos de Lo *et al.*¹⁶, em 1997, terem descrito a existência de ADN fetal livre (cfDNA) no plasma materno. Desde então, tem sido este o alvo revolucionário para o rastreio pré-natal não invasivo de aneuploidias.

3.4 ADN fetal livre

O ADN livre (cfDNA) consiste em pequenos fragmentos (<200 pares de bases)¹⁷ de ADN extracelular que circula livremente no plasma materno.¹⁸ Na gravidez, estes fragmentos de ADN têm origem materna e fetal, podendo ser detetados a partir das 4 semanas de gestação.¹⁹ Devido à sua origem fetoplacentar, acredita-se que o cfDNA fetal provém da apoptose das células sincio e citotroflobásticas da placenta.² A percentagem de cfDNA de origem fetal no plasma materno é conhecida como a fração fetal (FF).^{2,19} Os primeiros estudos sugeriam que a FF era de apenas 3,4 a 6,2%,²⁰ mas estudos mais recentes afirmam que a concentração de ADN fetal é, em média de 10%, podendo variar entre 5-15%.^{2,19} Para que o teste seja válido é frequentemente exigido uma fração fetal $\geq 4\%$ ^{21,22} uma vez que a eficácia de deteção de aneuploidias depende muito da FF existente na amostra. No entanto, estudos mais recentes referem que o nível de fração fetal mínima não deve ser fixa nos 4%, que a capacidade de determinar com eficiência casos de aneuploidia deve estar relacionado com os limites de deteção para cada abordagem TPNNI. Estes novos dados exigem que cada laboratório determine qual o seu valor cut-off apropriado para que a FF seja determinada com eficácia. De fato, há protocolos, que através do uso de sequenciação de nova geração - MPS (massively parallel sequencing), reportam a capacidade de determinar anomalias cromossómicas com frações fetais de apenas 2%, sem que a performance global do teste tenha sido alterada.²³

Sabe-se que há uma correlação negativa entre a FF e a obesidade materna, isto é, o aumento do peso materno representa um aumento do cfDNA materno (com origem no tecido

adiposo) e uma diminuição do ADN fetal atribuída a um efeito dilucional.^{18,24,25} Pelo contrário, a correlação com a idade gestacional é positiva, na medida em que a FF aumenta com o avançar da gestação (Figura 2).²⁴ No entanto, um feto aneuploide pode apresentar diferentes frações fetais consoante a trissomia que apresenta; uma FF elevada deve suspeitar da existência de uma trissomia 21, e FF baixas devem alertar para a possibilidade de estarmos perante um feto com trissomia 13 ou 18, estes resultados podem estar relacionados com o facto do volume placentário estar diminuído, fator que será abordado posteriormente.²⁴

O cfDNA tem um rápido turnover, com um tempo de semivida médio de 16,3 minutos (4-30), e assim, a vantagem de não ser detetado na circulação materna depois do parto,¹⁹ evitando fatores de confundimento em gestações futuras.²¹

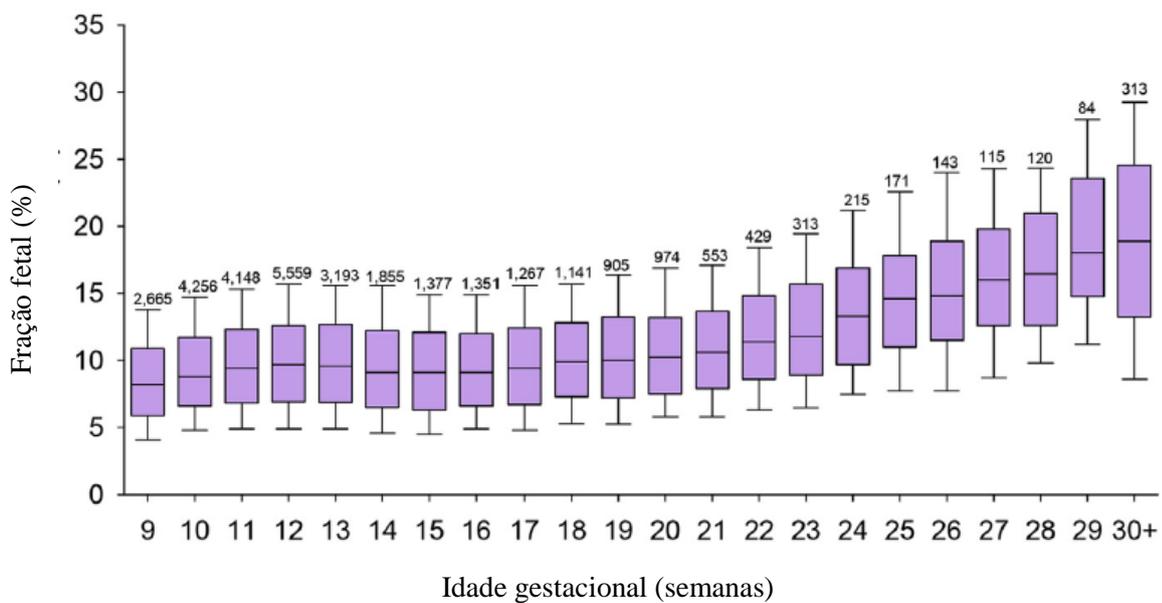


Figura 2. Efeito da idade gestacional na fração fetal.

Adaptado de Dar P. et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing (2014).²⁴

3.5 Testes pré-natais não invasivos

O Síndrome de Down tem uma incidência de 1 em cada 700-750 nados vivos, sendo esta a razão mais comum para que um teste invasivo de diagnóstico seja oferecido às grávidas. Os testes de rastreio desta e outras aneuploidias estão largamente difundidos por todo o mundo. Em média, de todas as mulheres rastreadas, 3 a 5% são identificadas como de alto risco e, por isso, sujeitas a testes invasivos. Ou seja, há mais mulheres sujeitas a exames invasivos de diagnóstico do que a própria incidência e risco da doença, e por isso, houve a necessidade de desenvolver testes de rastreio com taxas de falsos positivos inferiores, e assim, diminuir o número de mulheres que se submetem desnecessariamente a técnicas invasivas com riscos para o feto.^{26,27}

Os testes pré-natais não invasivos surgiram do desejo de evitar o contacto direto com o material fetal e com a placenta e, concomitantemente, do risco de lesão ou perda fetal. TPNNI (teste pré-natal não invasivo) refere-se então às técnicas que avaliam o ADN fetal livre no sangue materno ou células fetais provenientes de amostras sanguíneas maternas.¹⁵

O uso de ADN fetal livre como método de rastreio foi possível devido a dois grandes avanços: primariamente, pela descoberta da existência de ADN fetal (com origem sobretudo placentária) na circulação materna, acessível através de uma simples punção venosa e, finalmente, pela sequenciação de nova geração, em que todo o genoma humano foi identificado e catalogado, permitindo a identificação de determinadas sequências específicas pertencentes a um determinado cromossoma.¹⁷

Em 95% dos casos o Síndrome de Down resulta da presença de uma cópia adicional do cromossoma 21, totalizando 3 cópias (trissomia 21) no genoma do indivíduo afetado, ou seja possui mais 50% de material genético. O objetivo dos investigadores devotos ao TPNNI

foi desenvolver uma abordagem que detetasse no genoma do feto, através dos fragmentos de ADN livre, o aumento da carga genética pertencente ao cromossoma 21.²⁷

3.5.1 Tecnologias vigentes

Atualmente, existem 3 principais métodos (plataformas) de abordagem ao genoma através do cfDNA: shotgun (genome-wide) massively parallel sequencing (s-MPS), targeted massively parallel sequencing (t-MPS) que incide em cromossomas específicos e uma técnica designada SNPs (single nucleotide polymorphism) que faz uso de polimorfismos de nucleótidos.

Massively parallel sequencing (MPS), também referida como sequenciação de nova geração, assenta na identificação e comparação de um elevado número de fragmentos de ADN, e é utilizado para sequenciar, de um modo rápido e simultâneo, milhões de sequências do genoma quer fetal quer materno.²⁸ Cada porção mapeada corresponde a um discreto locus que é reconhecido como pertencente a determinado cromossoma.²¹ Pequenas sequências de ADN, chamadas de *reads*, pertencentes aos cromossomas de interesse são comparadas com *reads* de uma ou mais amostras euploides de referência. Se a quantidade de sequências lidas exceder o limiar representativo do cromossoma normal (dissómico), o resultado é considerado como positivo para trissomia do cromossoma em estudo (Figura 3). A avaliação é quantitativa e não qualitativa.¹⁵

Como o ADN materno representa a maior percentagem da amostra de ADN livre, a diferença devida à trissomia fetal é mínima quando as amostras maternas e fetais são quantificadas em conjunto. Isto leva a que a capacidade de detetar um incremento da cópia cromossómica resultante do feto aneuploide está diretamente relacionada com a fração de ADN livre fetal.¹⁵ Dado que o cromossoma 21 representa 1,5% de todo o cariótipo, uma cópia extra de ADN resulta num aumento de 1,5% para 2,25% (1,5% x 1,5). Se a fração fetal na

circulação materna é de apenas 10%, aproximadamente, a diferença relativa do incremento será de 1,5% para 1,575% ($[1,5\% \times 0,9]$ (cromossoma 21 da amostra materna) + $[2,25\% \times 0,1]$ (3 cópias do cromossoma 21 da amostra fetal) = 1,575%). Frações fetais inferiores originam diferenças ainda menores, daí a necessidade de frações fetais adequadas para aumentar a capacidade de detecção.¹⁵

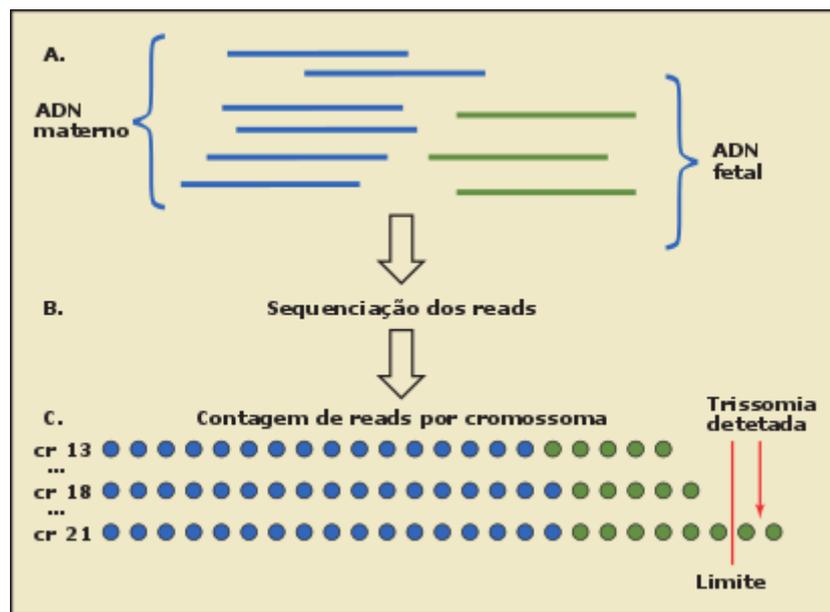


Figura 3. Massively parallel shotgun (MPS) na detecção pré-natal não invasiva de aneuploidia fetal. (A) ADN fetal (verde) circula no plasma materno numa pequena percentagem entre uma elevada quantidade de ADN materno (azul). A amostra de plasma materno é obtida. Pequenos fragmentos de ADN livre são sequenciados. (B) A origem cromossómica de cada sequência é identificada por mapeamento dos reads com o genoma humano de referência. (C) O número de sequências únicas mapeadas para cada cromossoma são depois contadas e o número de sequências de interesse são subsequentemente analisadas. A aneuploidia é detetada por técnicas estatísticas baseadas no número de reads representativas dos cromossomas de interesse e comparadas com outros cromossomas. Os círculos azuis e verdes representam os reads mapeados para cada cromossoma das frações de ADN materno e fetal, respetivamente. Não é possível distinguir a origem de reads individuais; apenas a diferença do número total de reads é que é detetada. Se os reads excedem o esperado, o feto é trissómico para aquele cromossoma (representado no cromossoma 21 acima).
Adaptado de Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now (2013).¹⁵

Targeted massively parallel sequencing (t-MPS) é uma abordagem semelhante à descrita anteriormente, mas ao invés de sequenciar fragmentos da totalidade de cromossomas, amplifica apenas sequências alvo específicas de regiões de interesse, e depois lê e compara as

mesmas com amostras euploides de referência. Esta estratégia permite reduzir grandemente o número de áreas analisadas e, conseqüentemente, o tempo despendido e os custos.^{15,21,28}

A abordagem SNP (single nucleotide polymorphism) faz uso das diferenças polimórficas do ADN entre a mãe e o feto ao comparar o sangue materno e o plasma materno (materno e fetal). A inclusão de uma amostra paterna (de sangue ou saliva) é benéfica mas não essencial. Apresenta a vantagem de proporcionar a origem parental de recombinações genéticas ou mutações.²⁸ É capaz de identificar a origem de pequenas alterações genéticas (fetais ou maternas) e quando estas têm origem materna evita que seja erradamente reportada como uma anomalia fetal. Outra vantagem é que não necessita de dados de referência externos.²⁹ No entanto, os polimorfismos de nucleótidos (SNP's) existem apenas em 1,6% do genoma humano, o que pode exigir um enriquecimento, sequenciação e amplificação do ADN fetal mais exaustivos.²¹

3.5.2 Performance no rastreio de aneuploidias

Os rastreios são implementados com o objetivo de identificar um risco aumentado para uma determinada doença ou defeito presumível não reconhecido anteriormente. Os testes utilizados devem ser facilmente aplicados, de um modo reprodutível, não tendo como objetivo o diagnóstico mas sim a identificação de indivíduos com um risco superior de determinada patologia, de modo a proceder ao seu posterior encaminhamento para exames de diagnóstico.³⁰

Assim, um teste de rastreio deve ter alta sensibilidade (identificar os verdadeiros doentes) e alta especificidade (excluir os indivíduos verdadeiramente não afetados, normais).

Enquanto que a sensibilidade e a especificidade são parâmetros importantes para a decisão clínica de implementação de rastreio, os valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN) têm uma relevância acrescida para o utente que recebe um resultado. O VPP reflete a

probabilidade de um teste positivo ser realmente positivo, traduzindo uma situação de doença, e o VPN o inverso: um teste negativo ser verdadeiramente negativo, ou seja excluir a presença de doença.

Enquanto que a sensibilidade e a especificidade não são influenciadas pela prevalência, o VPP e o VPN são influenciados significativamente pela prevalência.³¹

Diferentes estudos e meta-análises comprovam a elevada sensibilidade dos testes de rastreio não invasivo (TPNNI), alertando apenas para ligeiras diferenças na taxa de deteção dependentes do tipo de trissomia sob avaliação.¹⁷ A maioria dos ensaios incluíram como população mulheres identificadas previamente como de alto risco para trissomia, no entanto também há ensaios em curso, mais abrangentes, avaliando a população em geral, incluindo portanto também as mulheres com baixo risco.

Os estudos são consistentes, revelando uma sensibilidade para o Síndrome de Down de 99,3% (98,9% a 99,6%) com 0,09% de falsos positivos (0,05% a 0,14%).

No que diz respeito à trissomia 18, o Síndrome de Edwards, identificam-se sensibilidades entre 96,3% e 97,4% com 0,13% de falsos positivos e, finalmente, para a trissomia do cromossoma 13 (Síndrome de Patau), sensibilidades inferiores e oscilantes entre 91% e 97,4%, e taxas de falsos positivos sobreponíveis aos anteriores com 0,13%. A especificidade mostrou-se semelhante para todas as trissomias, com 99,9% de taxa. Da análise destes resultados, podemos inferir que a deteção da trissomia 21 é superior às taxas de trissomia 18 e 13.^{32,33}

Com a generalização do uso do TPNNI, houve necessidade de avaliar se a eficácia do teste era semelhante em mulheres que não tivessem sido avaliadas como de alto risco, uma vez que os resultados podiam não ser generalizáveis à população em geral. Os estudos que

têm vindo a ser publicados confirmam que o TPNNI é altamente preciso, e consistentemente, melhor que os testes standard atualmente em vigor, também em mulheres com baixo risco.¹⁹

Os estudos iniciais foram executados exclusivamente em mulheres com alto risco para aneuploidias, e dada a maior prevalência da doença neste grupo, o VPP esperado seria também maior (o VPP de um teste é influenciado pela prevalência da doença na população). No entanto, e lamentavelmente, estudos mais recentes não reportaram sistematicamente os VPP do teste, possivelmente porque ao fazer uso de populações de risco médio, o VPP do teste sofre um decréscimo, e possivelmente um impacto negativo na adesão e vendas, numa visão puramente economicista por parte dos laboratórios.

Um estudo em particular (Dar P *et al.*)²⁴ afirma que da análise da eficácia do teste em mulheres com baixo e alto risco, verificou que os valores preditivos positivos (VPP) eram semelhantes em ambos os grupos, algo que não seria de todo expectável. Em mulheres com um risco de aneuploidia inferior é esperado um VPP menor porque o número de gravidezes afetadas será menor e o número de falsos positivos (FP) previsíveis constantes. Dado que os VPP são similares nos diferentes grupos em estudo, poderá indicar que os FP, assim como, as gravidezes afetadas são proporcionalmente mais comuns em mulheres mais velhas (>35 anos), considerado um risco maior. Apesar desta constatação, este facto carece investigação complementar.²⁴

Não parecem existir diferenças significativas nos vários tipos de metodologia (s-MPS, t-MPS e SNP).³² No entanto, estudos que avaliam as taxas de falha na obtenção de um resultado relacionadas com a metodologia usada referem que métodos com base na massively parallel sequencing (MPS) obtêm taxas de falha menores (1,58%). A abordagem baseada em SNP (single nucleotide polymorphism) apresenta a maior taxa de 6,39%.³¹ Estas diferenças

estão relacionadas com o efeito de resultados não reportáveis ("*no calls*") que será abordado posteriormente.

Apesar deste teste de rastreio ser mais preciso do que qualquer teste realizado até ao momento, não é suficientemente sensível ou específico para ser considerado um teste diagnóstico, como se infere dos dados previamente referidos.³⁴

3.5.3 Falsos positivos, falsos negativos e resultados discordantes

Quando um resultado de rastreio tido como positivo é diferente do desfecho clínico (feto sem doença), este é referido como um falso positivo, existindo na maioria dos casos uma razão biológica para a sua ocorrência. E quando tal sucede é preferível designá-lo como um resultado discordante e não um falso positivo.³⁵ Um falso negativo ocorre quando o resultado do teste de rastreio é negativo mas os testes de diagnóstico identificaram o feto como portador da anomalia.

Apesar do cfDNA estar associado a altas taxas de deteção e a baixa taxa de falsos positivos, é preciso estar alerta para algumas situações em que fetos normais são identificados como potencialmente aneuploides, consequentemente obrigando a decisões com base num falso resultado. As possíveis causas de erro são a obtenção de amostras numa idade gestacional precoce, a obesidade materna, a gravidez múltipla, o mosaicismo confinado à placenta, o fenómeno de gémeo evanescente - doravante designado por *vanishing twin* - ou um tumor materno oculto.

1. Idade gestacional precoce

A porção de ADN fetal livre aumenta à medida que a gestação avança. Demonstrou-se que a FF aumenta 0,1% por semana entre as 10 e 21 semanas, a partir das quais, o aumento atinge 1% por semana.²⁹ Se as amostras forem obtidas muito precocemente, um falso negativo

torna-se mais provável de ocorrer por escassez de material fetal que não permita identificar o discreto aumento relativo à presença de uma cópia adicional do cromossoma. Muitos protocolos de rastreio de aneuploidias aplicam um valor mínimo de 4% de fração fetal para permitirem a detecção de resultados. Os testes que atualmente se encontram no mercado têm a indicação para serem aplicados apenas após as 10 semanas de idade gestacional, sendo por isso, a determinação rigorosa da idade gestacional imperiosa.³⁶

2. Obesidade materna

O índice de massa corporal é a variável materna que mais influencia a fração fetal. Múltiplos estudos que avaliaram esta variável demonstram, consistentemente, a influência do peso corporal materno. Grávidas com índice de massa corporal (IMC) mais elevado apresentam frações fetais menores devido a um efeito dilucional, conseqüente a um volume circulatório materno maior e devido à remodelação do tecido adiposo, que origina frações maternas superiores. O valor absoluto de ADN fetal não é afetado, mas devido ao aumento da quantidade de ADN materno a fração fetal sofre uma diminuição. Assim, a obesidade predispõe a resultados de TPNNI menos precisos.^{29,36}

3. Gravidez múltipla

Quando uma gravidez múltipla é monocoriônica, e por isso monozigótica, os fetos serão, à partida, portadores do mesmo cariótipo. Neste tipo de gravidez gemelar, como os gémeos têm o mesmo genótipo podemos encará-la como sendo única, e como o ADN fetal será, aproximadamente, o dobro da gravidez única, o teste de rastreio de aneuploidias é possível. A dificuldade surge quando a gravidez gemelar é dicoriônica, e os gémeos potencialmente discordantes em genótipo, uma vez que, apesar da fração fetal estar aumentada, a fração fetal por feto está reduzida, quando comparada com a gravidez de feto único, e as frações fetais fornecidas por cada feto poderem ser significativamente diferentes.

Um dos potenciais problemas da gravidez múltipla, e que já foi descrito, é um dos fetos ser normal e outro aneuploide, com o normal diluindo o resultado proveniente do que apresenta as anomalias cromossômicas.^{29,35,36}

Outra problemática que dificulta o rastreio em gémeos é a taxa de aneuploidias ser superior em gestações múltiplas comparando com gestações únicas.³⁵

Portanto, a aplicação da metodologia TPNNI na gravidez múltipla deve ser realizada com precaução, havendo ainda alguma reserva à sua utilização universal.^{1,35,37,38}

Apesar deste tema ser um problema comum e suscetível de discussão, não será alvo de enfoque deste trabalho, uma vez que nos objetivos se definiu que se abordaria apenas a utilização na gravidez unifetal.

4. Mosaicismo confinado à placenta

O mosaicismo é um fenómeno biológico já conhecido em que, no mesmo indivíduo, coexistem dois tipos celulares com genótipos diferentes.

A experiência com análises de biópsias das vilosidades coriônicas demonstra a existência de linhas celulares anormais na placenta que não se encontram representadas no feto. Cerca de 0,8-2% das gravidezes são afetadas por este fenómeno. A camada citotrofoblástica da placenta contém uma linha celular aneuploide resultante de uma não disjunção. Como a fração fetal de ADN provém sobretudo do trofoblasto da placenta, esta pode resultar num falso positivo, discordante, do cariótipo fetal.^{28,29,35,36}

Deste modo é necessária alguma precaução ao interpretar os resultados do rastreio porque a deteção das diferentes linhas celulares pode ser mais ou menos sensível. Nestas situações, um estudo ecográfico e um cariótipo por amniocentese podem ser o passo mais apropriado a realizar. Amostras das vilosidades coriônicas podem fornecer um cariótipo do

citotrofoblasto, que pode ser semelhante aos resultados anteriores de TPNNI e não do cariótipo fetal, e por isso, não ser benéfica a sua abordagem, dado que provém do mesmo fenómeno, o mosaicismo placentário.^{28,35}

5. Vanishing Twin

Vanishing twin é um fenómeno de reabsorção fetal, isto é, numa gravidez inicialmente múltipla ocorre a morte e reabsorção de um ou mais fetos. O fenómeno de perda espontânea de um embrião numa gravidez múltipla ocorre em cerca de 30-40% das gestações múltiplas no primeiro trimestre.³⁵ O desaparecimento daquele embrião está frequentemente associado a anomalias cromossómicas. Como o tecido placentário permanece após a inviabilização do feto, este pode ser fonte de falsos positivos do rastreio.^{28,35}

6. Tumor oculto materno

Resultados anormais de testes de rastreio podem ter como fonte uma anomalia cromossómica materna. Estudos mostraram que mulheres grávidas assintomáticas que apresentavam testes de rastreio de aneuploidias positivos durante a gravidez eram portadoras afinal de tumores ocultos. Cancros ocultos apresentam-se, frequentemente, associados a raros resultados de TPNNI com uma ou mais aneuploidias. Presume-se que os resultados discordantes sejam devidos à apoptose de células malignas para o plasma materno.³⁵

Quando múltiplas aneuploidias são detetadas nos testes de rastreio, é importante proceder à pesquisa de tumores ocultos na gestante, que possam ser fonte deste raro evento.²⁹

3.5.4 "No calls"

Os diversos estudos realizados até à data mostram resultados de extrema qualidade na deteção de trissomia 21 e 18 quando a sequenciação é bem sucedida. No entanto, existe uma pequena percentagem de casos em que não se obtém um resultado, chamados de "*no calls*".

Esta falha na obtenção de um resultado inclui os resultados não reportados, indeterminados ou não interpretáveis. As três principais razões que levam a que hajam falhas na obtenção de um resultado são as baixas frações fetais (<4%), problemas técnicos na obtenção, identificação e transporte da amostra ou falhas na análise: desde a extração de ADN, amplificação ou sequenciação.^{36,39} Dependendo do prestador do serviço, os "no calls" ocorrem, aproximadamente, em 1-10%.³⁶

Numa meta-análise recente (Gil *et al.*)³³, foram analisadas as taxas de falha na obtenção de resultados. As causas laboratoriais variam entre 0% e 8,8%, frações fetais inferiores a 4% resultam em 0,5-5,9% de "no calls" e falhas do método laboratorial foram responsáveis por 0,2-9,2%.

Outros estudos reportam 6,6% de amostras falhadas devido à baixa qualidade da amostra. Mas, de maior preocupação, foram os 1,9% resultados não reportados devido a ADN fetal insuficiente e razões técnicas, em que metade foi devido a baixa FF.²⁸

Como já foi anteriormente referido, a sensibilidade define a proporção de verdadeiros doentes entre os que têm o rastreio positivo e fornece a potencialidade do teste em identificar corretamente os fetos doentes. De acordo com a prática recente, o Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG) alertou para o facto de que os testes que não originam resultados são tipicamente excluídos das estatísticas das empresas, e assim, estas enfatizam a performance dos testes, nomeadamente a sensibilidade.³⁹ Um bom exemplo desta prática é o estudo que reportou uma sensibilidade de 100% nas amostras sujeitas ao teste depois de assegurado o controlo de qualidade e a existência de uma fração fetal suficiente. Ainda assim, o teste apenas identificou 58 dos 67 casos de trissomia do grupo em estudo. A sensibilidade com estes dados seria de 86,5% e não os 100% reportados. Os nove casos de trissomia que não foram detetados pelo teste de rastreio foram falsos negativos do teste ou obtiveram

resultados inconclusivos, ininterpretáveis ou insuficientes, ou seja, “*no calls*”, exames sem resultado.³⁹

A ACOG refere que, o modo como os exames sem resultado (“*no calls*”) são integrados influencia fortemente as taxas de detecção do teste em causa, em que o número de fetos afetados pode ser maior do que os descritos, assim como a taxa de falsos positivos. Dado que novas evidências afirmam que o grupo de “*no calls*” apresenta um risco maior de aneuploidia, é fortemente recomendado, pela ACOG, que seja oferecido a oportunidade de repetir o teste ou, inclusivamente, avançar para um teste diagnóstico. A Sociedade de Medicina Materno-Fetal (SMFM) recomenda, igualmente, que mulheres que apresentem resultados não reportados, indeterminados ou não interpretáveis, de testes de rastreio com cfDNA, recebam aconselhamento genético e seja oferecida uma avaliação ecográfica precoce e um teste diagnóstico.^{1,37-39}

Apesar de uma das recomendações face à falha na obtenção de um resultado seja proceder à repetição do teste com uma nova amostra, demonstrou-se que, na prática clínica, menos de 30% das segundas amostras são eficazes. Para além disso, o atraso na obtenção de um novo resultado poderá ter impacto na satisfação da mulher, além de limitar o período de tempo que a grávida tem para decidir. No entanto, optar por um teste invasivo irá aumentar as taxas de falsos positivos e diminuir o valor preditivo positivo deste teste, além de aumentar a taxa de perda fetal (inerente à técnica invasiva), mas apresenta a vantagem de originar um resultado válido mais cedo, permitindo à mulher alargar o tempo de decisão.³⁹

3.5.5 Métodos para implementação clínica

A investigação médica sugere 2 métodos para implementar a estratégia do ADN fetal livre (cfDNA): (1) uso primário como teste rastreio universal, oferecido a todas as mulheres, substituindo os métodos de rastreio convencionais, (2) e uso secundário, sendo oferecido

apenas a mulheres com testes de rastreio prévios positivos, que é dividido em dois tipos: o modelo contingente e o modelo reflexivo.⁴⁰

1. cfDNA primário

O uso desta estratégia como rastreio primário implica que a qualquer mulher que deseje um rastreio de aneuploidia seja oferecido como primeira linha de abordagem a possibilidade de realizar o estudo do ADN fetal livre. No entanto este método apresenta-se ainda bastante dispendioso, para além de se perderem as vantagens que o rastreio combinado oferece à grávida, nomeadamente a realização precoce de uma avaliação ecográfica, que permite a pesquisa e identificação de outras anomalias além das aneuploidias fetais.

A aplicação do método como primeira linha também exigirá às autoridades de saúde o delineamento de normas para aplicar este novo método, nomeadamente o momento ideal para que ocorra a colheita (maioria sugere que seja depois das 10 semanas de gestação, dado que existem melhores taxas de deteção com o avançar da idade gestacional), e qual a metodologia e encaminhamento a aplicar após um teste positivo.^{28,36}

2. cfDNA secundário

Por definição, o rastreio secundário consiste na possibilidade de realizar um novo teste de rastreio alternativo após ter sido obtido um resultado positivo num teste de rastreio preliminar, previamente realizado. Para o Síndrome de Down, por exemplo, o teste de rastreio preliminar inclui a idade materna ≥ 35 anos aquando o parto, anomalias ecográficas indicativas de risco aumentado (aumento da translucência da nuca), teste de rastreio bioquímico alterado (teste combinado do primeiro trimestre), história familiar de aneuploidia positiva, ou translocação Robertsoniana relevante nos progenitores.

O objetivo do rastreio secundário é usufruir da alta sensibilidade e especificidade do cfDNA. A alta especificidade permite que ocorra uma redução significativa do número de

testes diagnósticos invasivos desnecessários nas mulheres em que é improvável que sejam portadoras de um feto aneuploide, apesar dos testes previamente realizados, com menor sensibilidade e especificidade, as tenham classificado como de alto risco. A elevada sensibilidade assegura que as poucas mulheres com uma gravidez afetada não sejam reclassificadas, incorretamente, como de baixo risco. Uma vez que a maioria das mulheres obtêm um resultado de cfDNA com um baixo risco antes de se submeterem a um exame diagnóstico, como a amniocentese, permitindo assim a evicção de um teste invasivo. O alto custo do teste de rastreio através de cfDNA pode ser justificado pela poupança num teste invasivo desnecessário evitado. Ainda que o cfDNA possa falhar e não originar um resultado (numa pequena percentagem de casos), às mulheres previamente classificadas como de alto risco deve ser oferecido um teste diagnóstico.

Existem dois modelos para aplicar o rastreio secundário na população em geral: o modelo contingente e o modelo reflexivo. Os objetivos dos mesmos são aumentar a deteção, diminuir a taxa de falsos positivos e manter os custos relativamente constantes.

No modelo contingente, é oferecido primariamente às mulheres um teste de rastreio combinado com dois pontos de corte (1:150 e 1:1000), classificando-as em alto risco (risco >1:150) identificando um grupo que pode optar por realizar diretamente um teste invasivo ou realizar um segundo teste de rastreio, o cfDNA; o grupo de baixo risco (risco <1:1000) que recebe um acompanhamento pré-natal convencional sem que se realizem outros testes adicionais e um novo grupo definido como de risco intermédio (1:151 a 1:1000) representando 8-10% da população rastreada e englobando 10 a 12% dos casos de Síndrome de Down. As mulheres devem ser informadas do seu risco intermédio e oferecido a possibilidade de realizar TPNNI após aconselhamento. Se o resultado for positivo é obrigatória a realização do teste invasivo.

É interessante a perspectiva de que as mulheres com risco intermédio possam ser acompanhadas e aconselhadas para testes adicionais. Este modelo permitirá que a taxa de deteção aumente devido aos 10 a 12% de população a quem é oferecido este segundo rastreio. Por outro lado, o uso de um segundo teste de rastreio resulta num acréscimo de falsos positivos (0,1-0,2%) e em testes invasivos desnecessários.

O segundo modelo (modelo reflexivo) utiliza os mesmos pontos de corte do modelo contingente mas obtém uma amostra de plasma aquando a amostra de sangue para o teste bioquímico do rastreio combinado do 1º trimestre. Às mulheres designadas como de alto risco é oferecida a possibilidade de realizar o cfDNA ou diretamente o teste invasivo; às mulheres de baixo risco é oferecido o acompanhamento de rotina. Ao obter a amostra de plasma, as mulheres com risco intermédio são imediatamente rastreadas com cfDNA, evitando a necessidade de uma sessão extra de aconselhamento e de punção venosa.^{28,36}

3.5.6 Aconselhamento genético

O rastreio e diagnóstico pré-natal devem ter sempre como base o princípio da escolha informada, o que implica que cada mulher grávida deve ter a oportunidade de receber toda a informação necessária e possível, de modo a tomar decisões informadas sobre a sua própria gravidez. Este modelo maximiza a autonomia do utente nas decisões reprodutivas e tem sido adotado a nível mundial pelos serviços de saúde. Tem como objetivo informar sobre as anomalias cromossómicas em rastreio (trissomias 21, 18 e 13), e aconselhar independentemente do risco específico que a mulher possa apresentar em ser portadora ou não de um feto aneuploide, oferecendo e explicando todas as opções disponíveis de rastreio, suas vantagens e inconvenientes das diferentes opções de teste. Depois de revistas e analisadas todas as alternativas, cada utente tem o direito de prosseguir ou negar a realização dos testes.

No caso específico do TPNNI deve ser explicado que este é um teste de rastreio e não de diagnóstico e por isso não substitui um teste confirmatório quando o resultado é positivo. Deve ser explicada que a fonte de informação é o ADN fetal livre obtido através da venopunção periférica da gestante. Que além de poderem ocorrer falsos positivos, que um teste positivo não determina que o feto seja doente ou se a trissomia é livre ou devida a uma translocação, e portanto se há o risco de recorrência numa futura gestação, bem como o grau de incapacidade que a anomalia pode gerar. É importante informar que caso o rastreio seja positivo, ou seja, haja um risco aumentado de aneuploidia o passo seguinte recomendado será a realização de um teste confirmatório (de diagnóstico). Devem ser explicados os riscos e os benefícios de proceder ao diagnóstico definitivo através da biópsia das vilosidades coriônicas ou amniocentese.

Se já tiver sido detetada uma anomalia estrutural no exame ecográfico deve ser oferecido um teste diagnóstico ao invés do teste de rastreio adicional, de modo a ter uma janela temporal mais oportuna para tomar decisões. Além disso, a mulher deve ser informada de que o teste não avalia todas as doenças genéticas ou anomalias cromossômicas. Por exemplo aberrações subcromossômicas ou doenças monogénicas não são alvo de deteção. No entanto, o TPNNI pode indicar outras anomalias fetais e até maternas além das aneuploidias para o qual foi desenhado, tal como já foi anteriormente explicitado.

Dados estatísticos como a sensibilidade, especificidade ou valores preditivos (positivo e negativo) devem ser fornecidos e esclarecidos os significados dos mesmos.

O aconselhamento deverá incluir educação e preparação para a família, assim como opções sobre adoção, aborto ou referenciação para um centro especializado para o parto, se necessário. Os pais que possuem filhos com anomalias cromossômicas, frequentemente,

beneficiam da referência para profissionais, nomeadamente geneticistas, para aconselhamento mais detalhado.

A informação deve ser fornecida de um modo compreensível e de fácil entendimento, ajustada ao nível de instrução, e acompanhada de momentos oportunos para fazer questões. Assim e respeitando os valores éticos e culturais da grávida, a sociedade em que esta se insere e os seus desejos esta deve ter a informação necessária para tomar decisões informadas sobre os testes de rastreio e diagnóstico pré-natais.^{1,2,34,38}

3.5.7 Resultado TPNNI positivo - e depois?

Os laboratórios apresentam diferenças no modo como os testes de rastreio são considerados positivos. O risco de aneuploidia é geralmente reportado como "positivo", "detetado" ou como uma probabilidade >99% em como a mulher tem um risco aumentado.

Independentemente do modo como o risco é reportado, é importante informar que o teste realizado é um teste de rastreio e não diagnóstico, e por isso, não devem ser tomadas medidas definitivas com base apenas naquele resultado.

Após um TPNNI positivo, as mulheres consideradas com alto risco de aneuploidia devem ter a oportunidade de serem referenciadas a aconselhamento genético pós-teste com médicos especialistas na área do diagnóstico pré-natal. A discussão deve incluir o valor preditivo positivo do cfDNA, incluindo a possibilidade de o teste ser um falso positivo. Depois do aconselhamento deve ser oferecido à mulher a oportunidade de se sujeitar a um teste diagnóstico, através da amniocentese ou da biópsia das vilosidades coriônicas, para que um resultado definitivo seja alcançado, particularmente àquelas que pretendem interromper a gravidez caso o resultado positivo se venha a confirmar.^{1,17}

3.5.8 Custo-efetividade

Os custos em saúde e as prioridades variam consideravelmente entre países. Em determinados países a saúde é maioritariamente baseada em serviço público - serviço nacional de saúde e na segurança social, enquanto que noutros se baseia em seguros de saúde privados e escolhidos segundo as possibilidades monetárias individuais.

Atualmente, e independentemente do sistema de saúde, o cfDNA é mais dispendioso do que os testes de rastreio convencionais.

Num sistema público de saúde são importantes duas medidas de custo: o custo médio por nascimento afetado evitado pelos diferentes testes de rastreio e o custo marginal por nascimento evitado pelo novo teste em relação aos já existentes. Estes custos dependem do preço individual dos testes de rastreio convencional, teste cfDNA e dos testes diagnósticos.

Para comparar os custos entre os diferentes testes foi realizado um estudo em que os preços se baseiam em unidades de custo de um teste combinado (uC). A unidade de custo admitida para o cfDNA foi de 4*uC, e de um teste diagnóstico foi de 8*uC, assumindo que a adesão aos testes de rastreio, aos testes invasivos e à interrupção médica da gravidez eram de 100%. No modelo usado, previu-se que o custo médio por um nascimento com trissomia 21 evitado com o teste combinado era de 1300*uC e com o uso primário de cfDNA era de 3100*uC. O custo marginal demonstrou-se muito mais dispendioso em 13000*uC. No entanto, ao usar o cfDNA numa abordagem contingente o custo marginal era de 3400*uC. Para que o uso primário tivesse o mesmo custo marginal da abordagem contingente era necessário que o custo individual do cfDNA se reduzisse a 2*uC. Estes cálculos revelam que o uso de cfDNA implica elevados custos na sua implementação. No entanto, quando o TPNNI é usado numa abordagem contingente os seus custos podem ser francamente mais acessíveis.²⁸

À medida que a tecnologia se torna mais acessível, o custo de sequenciação irá inevitavelmente diminuir. No entanto, podem surgir custos adicionais relacionados com a reivindicação dos custos de propriedade intelectual.³⁶

Para melhor avaliar o custo efetividade são necessários estudos que avaliem os efeitos a curto e longo prazo da implementação do TPNNI. Sabe-se que o uso de TPNNI tem influência no número e tipos de testes realizados, nomeadamente na redução do número de testes invasivos, e conseqüentemente, a redução do número de perdas fetais. Também é necessário avaliar se os custos, a longo prazo, relacionados com o nascimento de um feto aneuploide justificam a implementação do TPNNI. No entanto, esta medida de custo relacionada com as despesas que uma criança nascida com trissomia 21 acarreta para os serviços públicos implica sérias questões éticas.

3.5.9 Controvérsias

O rastreio pré-natal de aneuploidias e a conseqüente necessidade de aconselhamento pré e pós-teste exige esforços adicionais no acompanhamento das gestantes. A oportunidade de oferecer TPNNI criou inúmeras questões relacionadas com a interrupção da gravidez nos casos afetados, a equidade de acesso, a informação disponibilizada e a inexistência de normas reguladoras.

O principal objetivo do rastreio pré-natal não é prevenir o nascimento de crianças com anomalias fetais, mas sim ajudar a mulher grávida a tomar decisões reprodutivas de forma informada, a conhecer o seu risco individual de ser portadora de um feto aneuploide e decidir se pretende técnicas de diagnóstico que em caso de positividade motivam discussão quanto a continuar a gravidez, para a qual se deve preparar tendo em conta as circunstâncias ou decidir interromper aquela gestação. Todavia, a oferta generalizada do rastreio de aneuploidias pode ter como conseqüência a diminuição do número de crianças nascidas com estas anomalias.²

Com o uso de um teste de rastreio (TPNNI) mais fácil, acessível, preciso e fiável o número de fetos diagnosticados, não só portadores de aneuploidias mas também de outras condições genéticas, poderá levar ao aumento do número de interrupções da gravidez. A preocupação reside no fato de que com o TPNNI as mulheres tenham acesso ao diagnóstico de determinadas anomalias mais cedo e que tal faça com que a interrupção médica da gravidez se torne mais comum. Adicionalmente, teme-se que possa ocorrer um efeito negativo na população portadora dessas mesmas anomalias, nos seus estatutos e num possível menor interesse da comunidade médica nesses indivíduos: quer em novas pesquisas, tratamentos ou até mesmo cuidados.¹⁹ Ao enfatizar a prevenção ao invés do suporte e comodidade para as incapacidades, até mesmo ocorrer uma transformação de atitudes nos indivíduos com trissomia 21 e até dos seus pais que optaram por não rastrear ou terminar a gravidez.²¹

Atualmente, se a grávida optar por realizar o TPNNI, exige-se que os custos inerentes ao teste fiquem a cargo da mesma, uma vez que, o TPNNI ainda não é suportado pelos serviços públicos de saúde. Devido ao elevado custo pode-se estar perante uma questão ética ao limitar a igualdade de acesso e equidade. Limita-se porque apenas os indivíduos com possibilidades monetárias é que têm acesso ao teste de rastreio não invasivo e a um acesso privilegiado e mais precoce do aconselhamento genético, o que origina também a possibilidade de terminar a gestação mais precocemente. Num sistema de saúde público disponibilizar TPNNI, como primeira linha de rastreio de aneuploidias, ainda é considerado como muito dispendioso, e não custo-efetivo.

Atualmente, o TPNNI já permite rastrear mais patologias além das aneuploidias mais frequentes, inclusivamente sequenciar todo genoma, o que pressupõe implicações éticas enormes. Ao fornecer informação detalhada sobre o genoma (materno e fetal) pode-se ter acesso a informações básicas como o tipo de sangue fetal mas também a informação mais sensível, como o risco de doenças como o cancro da mama, através da presença do gene

BRCA1/2, ou de patologias neurodegenerativas como a Doença de Huntington ou Alzheimer. Usufruir desta informação poderá não só trazer implicações para a mãe como para o futuro nascituro. Desta maneira podemos estar a fornecer informação sobre a predisposição para determinados neoplasias ou outras doenças com base genética, sendo que ser portador desta informação pode ter grande influência futura na forma de ser e de estar do feto/criança afetada. Com esta possibilidade surge também a questão se toda esta informação deve ser fornecida, se deve ser armazenada em bases de dados e inclusivamente que organizações ou pessoas é que vão poder ter acesso a informação com tantas implicações.⁴¹

Por fim, outra questão que gera alguma polémica e preocupação é o facto de ainda não existirem normas que assegurem a correta e universal implementação do rastreio. Além da atual ausência de diretrizes quanto a controlo de qualidade e de garantia de qualidade externas por parte das empresas que disponibilizam o serviço. A análise metodológica e computacional é altamente complexa e as agências reguladoras dos laboratórios devem desenvolver e implementar requisitos específicos para os procedimentos laboratoriais, das amostras, relatórios e armazenamento dos dados.³⁹

3.5.10 Impacto real do uso de TPNNI

O rastreio pré-natal não invasivo (RPNNI) já tem e terá cada vez mais influência na área do diagnóstico pré-natal. Como qualquer inovação tecnológica a sua introdução inicial na prática clínica gerou incertezas nos utentes e nos prestadores de cuidados de saúde. Previamente à sua introdução a grande apreensão relacionava-se com o custo relativamente alto comparativamente com os testes de rastreio tradicionais em vigor, e o menor conhecimento do mesmo, quer pela população em geral, quer pelos próprios serviços de Obstetrícia que estão ainda a organizar-se para implementar esta tecnologia.

Após a introdução dos testes não invasivos e com a melhoria constante da sua disponibilidade comercial, a apreensão inicial rapidamente foi dissipada dando lugar a um uso crescente do rastreio em diferentes países. No entanto, e de acordo com um estudo realizado por Minear *et al.*², existem diferenças substanciais no modo como o rastreio é implementado, indicando a necessidade de serem criadas normas nacionais e internacionais para a implementação do TPNNI. São exemplo destas diferenças protocolares o rastreio aplicado na Holanda e no Reino Unido, em que o teste de rastreio é adequadamente oferecido a mulheres com alto risco (baseado na história de gravidez prévia com feto aneuploide, translocações Robertsonianas parentais equilibradas, idade materna ou depois de elevado risco no teste combinado do primeiro trimestre). No entanto a diferença está em como é definido o "alto risco", isto é, na Holanda as mulheres são elegíveis se apresentarem um risco ≥ 1 em 200 e no sistema nacional de saúde do Reino Unido esse risco é definido se ≥ 1 em 1000.²

É claro que o modo como o protocolo é implementado depende muito da tecnologia de rastreio mas também da economia do país em questão. Apesar das questões económicas há que ter limiares de rastreio definidos, de modo a permitirem ou impedirem escolhas reprodutivas, para além de estarem de acordo com os próprios objetivos da sociedade.

A capacidade do TPNNI para realizar o rastreio de um modo não invasivo, sem riscos para o feto e para a gestante e ser passível de se realizar precocemente na gravidez, foram as características que levaram à tão grande aceitação por parte das mulheres grávidas.

A introdução do cfDNA na prática clínica teve um impacto sem precedentes devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. Estudos de impacto do teste realizados nos Estados Unidos da América (EUA) revelam que, se dada a opção de escolha, o TPNNI é preferido (69%) em detrimento do rastreio integrado (0,6%), do teste diagnóstico (14,1%) ou da não realização de rastreio (16,6%). Outros estudos revelam que durante o primeiro ano de

implementação do rastreio não invasivo o número de rastreios combinados diminuiu em cerca de 50%. Apesar disso o número total de rastreios não se alterou significativamente, ou seja, o número de mulheres consideradas como alto risco manteve-se. Mas dada a opção de realizar TPNNI, este é preferido, ao invés do teste combinado, provavelmente devido à maior sensibilidade e menor taxa de falsos positivos do TPNNI.

Um dos efeitos mais importantes da introdução clínica do TPNNI relaciona-se com o decréscimo profundo do número de procedimentos diagnósticos. Mesmo antes da sua introdução já se previa uma diminuição acentuada do número de testes diagnósticos. Diferentes estudos retrospectivos compararam o número anual de exames de diagnóstico invasivos antes e após a introdução do cfDNA. Como representado na Figura 4, ocorreu um decréscimo no número de amniocenteses (Figura 4A) e de biópsia das vilosidades coriônicas (Figura 4B) de 76% e 54%, respetivamente. De notar que o número de amniocenteses já apresentava um decréscimo previamente à introdução do TPNNI, tendo esta diminuição começado com a introdução do rastreio combinado do primeiro trimestre.⁴²

Outros grupos de trabalho nos EUA reportaram reduções similares dos testes invasivos, valores variáveis entre 17 e 30%. Outros países reportaram decréscimos também sobreponíveis com 50-91% no Canadá, 55-66% na Bélgica, 67% na Suíça e 28% na China.⁴²

É possível que o TPNNI influencie o número de testes diagnósticos, dado que este pode ser implementado a partir da décima semana de gestação. Mulheres que tenham sido rastreadas como de risco acrescido por um método convencional e, posteriormente sejam submetidas a um TPNNI, perdem a janela de oportunidade de realizar o teste diagnóstico com BVC, logo irá ser sujeita em caso de necessidade a uma amniocentese. De um modo semelhante, as mulheres que realizam apenas o rastreio do segundo trimestre e são consideradas de alto risco frequentemente optam por um teste diagnóstico em vez do TPNNI.

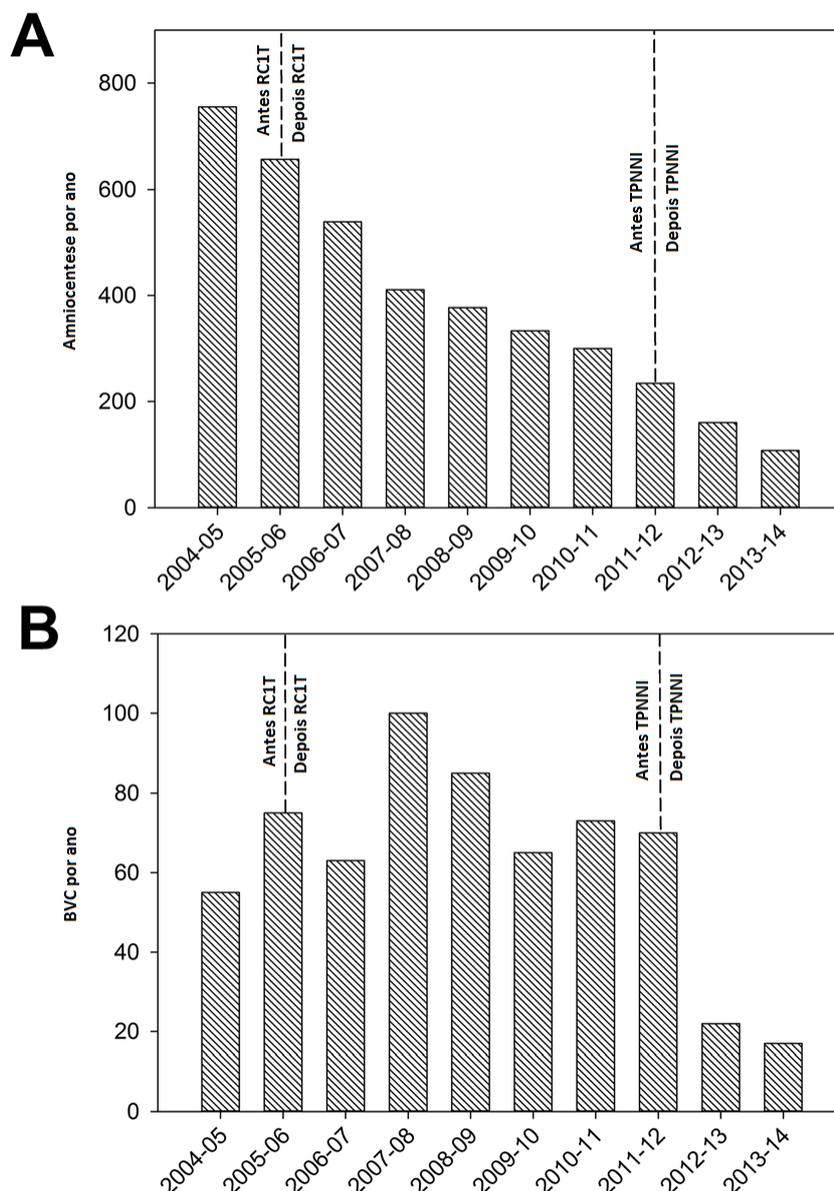


Figura 4. Amniocentese (A) e BVC (B) antes da introdução do rastreio combinado do primeiro trimestre em 2006 e teste pré-natal não invasivo em 2012.

BVC. biópsia das vilosidades coriônicas; RCIT, rastreio combinado do primeiro trimestre; TPNNI, teste pré-natal não invasivo.

Adaptado de Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures (2015).⁴²

Ao implementar o TPNNI reduz-se não só o número de testes de diagnóstico realizados mas também o número de perdas fetais provocados pelas técnicas invasivas. No entanto, e conseqüentemente ao menor número de procedimentos executados, a capacidade de execução dos mesmos pelos médicos, torna-se menos eficiente ou mesmo deficitária, devido à

falta de treino, o que poderá aumentar o risco de complicações durante a sua execução. O que leva assim à necessidade de alerta para o facto de que quantos mais testes diagnósticos forem praticados por um técnico, maior será a taxa de sucesso e menores as complicações relacionadas com o procedimento, comparativamente com técnicos que executem um número menor de exames. Assim, a redução dramática da técnica poderá pôr em perigo a capacidade do médico praticante em manter as habilidades operacionais necessárias para a técnica. Portanto, os benefícios provenientes da diminuição dos exames diagnósticos, descritos anteriormente, poderão ser acompanhados por um aumento das falhas do teste e de perdas fetais.^{42,43} Esta constatação exige uma avaliação cuidadosa das diretrizes de instrução dos médicos para que seja assegurada um elevado nível de qualidade dos cuidados prestados às grávidas e à população.

No que diz respeito ao número de crianças nascidas com trissomia 21 não se sabe se a introdução do TPNNI teve alguma influência. Sabe-se que a taxa de deteção não sofreu alterações, o que sugere que a introdução do TPNNI não afetou (nem positivamente nem negativamente) a capacidade de detetar fetos com trissomia 21. Quanto ao verdadeiro impacto do rastreio nas crianças nascidas com trissomia 21, este não será conhecido até que o mesmo esteja disponível à população obstétrica em geral.

Um estudo para avaliar a taxa de fetos nascidos afetados com trissomia 21 revelou que apesar da idade materna média ter aumentado significativamente entre 1990 e 2009, e das medidas de rastreio terem sido amplamente melhoradas a prevalência da doença não sofreu alterações.

Caso o TPNNI se torne um teste de rastreio primário, haverá uma diminuição do interesse em manter a prática corrente com o teste combinado do primeiro trimestre. No entanto, o rastreio combinado ao usar a ecografia fetal realizada entre as 11-13 semanas tem o benefício de identificar outras anomalias além das aneuploidias, além de que uma ecografia é

de extrema importância na determinação correta da idade gestacional, que é fulcral para a correta implementação do próprio TPNNI. O comprimento céfalo-caudal medido no primeiro trimestre é considerado o método mais eficaz a estimar a idade gestacional. Outra vantagem da ecografia é diagnosticar a gravidez múltipla e nestas determinar atempadamente a corionicidade. As normas internacionais também recomendam que concomitantemente sejam avaliados os órgãos pélvicos maternos.

A ecografia é um exame que permite detetar inúmeras anomalias estruturais fetais, são exemplos disso as anomalias cardíacas, a hidrósia, um higroma quístico ou até anomalias do tubo neural como a espinha bífida. Um valor acima do percentil 95 da translucência da nuca está associado a um risco aumentado de defeitos pulmonares, gastrointestinais, geniturinários ou músculo-esqueléticos. Todas estas anomalias são passíveis de serem identificadas através de uma simples ecografia de rotina, realizada no 1º trimestre.

A incidência de complicações materno-fetais é maior do que as aneuploidias e as anomalias estruturais fetais combinadas. Muitos casos de pré-eclâmpsia e de restrição do crescimento intra-uterino podem ser prevenidos através da ecografia do primeiro trimestre com avaliação Doppler das artérias uterinas, a medição da pressão arterial e doseamento de proteínas plasmáticas maternas (PAPP-A e PIGF).

Portanto o rastreio convencional, através da ecografia e dos testes bioquímicos maternos, tem aplicações além do rastreio de aneuploidias e por isso a sua manutenção deverá ser ponderada tendo em conta o seu valor económico e obstétrico.²⁸

3.5.11 Experiência europeia com TPNNI

A maioria dos estudos sobre o teste de rastreio não invasivo são realizados nos Estados Unidos, então, de modo a avaliar e analisar eventuais semelhanças com a população portuguesa, incluiu-se na pesquisa bibliográfica dois estudos que avaliam o teste de rastreio

em populações europeias da Holanda, Bélgica e Suíça, ainda que estes países em estudo tenham um contexto económico-financeiro bastante distinto de Portugal.

A prática de rastreio pré-natal na Bélgica e na Holanda⁴⁴ é feita através do teste de rastreio combinado (idade materna, translucência da nuca, β -hCG e PAPP-A), em que se oferece um teste invasivo (amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas) a todas as grávidas com alto risco de aneuploidia no teste combinado ($>1/200$ na Holanda e $>1/300$ na Bélgica). Enquanto que na Bélgica os testes de rastreio e de diagnóstico são suportados pelo Sistema de Segurança Social para todas as mulheres, na Holanda estes apenas são suportados nas mulheres com idade igual ou superior a 36 anos durante a 18ª semana de gravidez ou se apresentarem outra indicação formal para a realização de teste invasivo. No período de tempo entre Março e Dezembro de 2013 foram seleccionadas os primeiros 3000 testes de rastreio não invasivos com o teste *Harmony*[®] para estudo. Nas conclusões do estudo foi afirmado o valor clínico do novo teste de rastreio das trissomias 21,18 e 13. Foram detetadas 57 trissomias, 32 gravidezes não obtiveram resultado, os chamados "*no calls*", e as restantes 2911 eram normais. Não foram obtidos testes com resultados falsos positivos, no entanto, foram obtidos 2 resultados falsos negativos (uma trissomia 18 e uma trissomia 21) sem que tenham sido esclarecidos as causas para tais erros. A taxa de falha na obtenção de resultados foi baixa, em que em 1,83% dos casos foi devido à baixa percentagem de cfDNA ($<4\%$) e em 0,90% a fração fetal foi igualmente baixa numa segunda amostra.

Assim, o TPNNI foi considerado um teste de rastreio pré-natal fidedigno, com baixas taxas de falsos positivos ou negativos. Inclusivamente, foi considerado que dada a sua alta eficiência, poderá substituir os testes de rastreio em vigor, nos anos vindouros, apesar do seu alto custo. Este alto custo e o facto de não ser ainda subsidiado universalmente pelos serviços públicos de saúde são os fatores que ainda impedem muitas mulheres de não optarem pelo teste como primeira linha.

Na Suíça⁴⁵ foi realizada uma análise de dados retrospectivamente para avaliar o impacto antes e depois da introdução do TPNNI. O teste de rastreio não invasivo não foi aplicado como primeira linha em contexto de rastreio universal. O período de tempo em avaliação foi de Outubro de 2011 a Março de 2013. Durante o período observacional constatou-se uma diminuição significativa do número de ecografias do 1º trimestre depois da introdução do TPNNI, assim como a redução do número de procedimentos invasivos para diagnóstico pré-natal (67,4%). Constatou-se que o TPNNI é um teste com alta fiabilidade e que o maior desafio que impõe é um aconselhamento mais exigente e complexo. A limitação do estudo está relacionada com o pequeno número de testes realizados, apenas 40.

Conclui-se da análise dos estudos referidos que o atual desafio é desenvolver um algoritmo capaz de integrar esta tecnologia nas diretrizes nacionais de rastreio pré-natal. E assim, permitir um acesso através do sistema de saúde e oferecê-lo a todas as mulheres que, de uma perspetiva de saúde pública, possam verdadeiramente beneficiar do TPNNI.

3.5.12 Pareceres e Opiniões das distintas sociedades científicas

As considerações clínicas e recomendações que se seguem resultam de pareceres e opiniões do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG), da Sociedade de Medicina Materno Fetal (SMFM), da Sociedade de Obstetrícia e Ginecologia do Canadá (SOGC) e do Colégio Inglês de Obstetras e Ginecologistas (RCOG).^{1,17,36-38,46}

É do consenso comum que os recentes avanços tecnológicos criaram excelentes oportunidades para melhorar as opções de teste genético disponíveis durante a gravidez.

A novidade e a promessa de elevadas taxas de sucesso desta nova tecnologia, e o interesse comercial por parte dos laboratórios trouxeram desafios aos médicos e aos utentes que, por vezes, levaram a conclusões precipitadas e a mal entendidos iniciais. De tal modo,

que as sociedades internacionais tiveram a necessidade de elaborar pareceres e opiniões sobre a implementação do novo teste de rastreio na prática clínica diária.

A opção de rastreio e diagnóstico de aneuploidias deve ser oferecida a todas as mulheres grávidas, independentemente do tipo de testes ou da idade materna. A escolha do tipo de teste é afetada por diversos fatores, incluindo o próprio desejo de informação e a oferta específica disponível em cada instituição. A escolha é determinada pelos fatores individuais da grávida e após a mesma ter tido aconselhamento adequado. Deve ser explícito que nenhum teste é superior em todas as características, e que nem todos estão disponíveis em todos os centros. As vantagens e desvantagens dos testes devem ser discutidas com cada utente na consulta de aconselhamento pré-teste.

Em relação ao teste de rastreio não invasivo através da pesquisa de ADN fetal livre é reconhecido o seu valor clínico desde 2011, em que a ACOG recomendou o seu uso como opção de rastreio nas mulheres consideradas como de alto risco de aneuploidia fetal (estratégia contingente).

O cfDNA é um teste com elevada sensibilidade e especificidade para a trissomia 21 e 18, independentemente da metodologia usada, enquanto que a sensibilidade na deteção da trissomia 13 é um pouco inferior, com taxas médias entre 80-90%, mas a especificidade mantém-se elevada, com valores maiores ou iguais a 99%. Apesar das elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, o cfDNA é um teste de rastreio e como tal, tem potencial para que ocorram falsos positivos e falsos negativos, assim, não deve ser usado como substituto a um teste diagnóstico. A existência de um teste positivo não assegura em 100% a existência de um feto aneuploide, podendo, inclusivamente, existir outras causas além da aneuploidia, fetais ou maternas, para um teste positivo. Por esta razão, não devem ser tomadas quaisquer tipo de atitudes definitivas com base apenas no teste de rastreio, nomeadamente a interrupção da

gravidez. A ocorrência de um teste de rastreio positivo pressupõe aconselhamento pós-teste e a oferta adicional de exames de diagnóstico. Às mulheres com um teste de rastreio convencional positivo pode ser oferecido a possibilidade de realizar outro teste de rastreio, como o TPNNI (com maior sensibilidade e maior especificidade), ou um teste diagnóstico como a BVC ou a amniocentese. No entanto, a abordagem com os dois testes de rastreio poderá induzir um atraso na obtenção de um diagnóstico definitivo e na sua conduta posterior. Abordagens de rastreio paralelas ou múltiplas não são custo-efetivas nem recomendadas, num contexto de prática generalizada.

A ocorrência de testes sem resultados, indeterminados ou ininterpretáveis (um teste "*no call*") deve originar esforços para que seja proporcionado aconselhamento genético e oferecida a possibilidade de realização de outros testes como a ecografia ou exames de diagnóstico. Os "*no calls*", frequentemente associados a baixas frações fetais, apresentam um elevado risco de aneuploidia, logo devem ser orientados em conformidade.

O teste pode ser realizado a partir das dez semanas de gestação e até ao final da mesma. Apesar da existência de sensibilidades e especificidades aparentemente semelhantes entre a população de alto risco e a população em geral, não está ainda recomendado o seu uso generalizado, dado que em gravidezes de baixo risco a sua eficiência poderá não ser a mesma devido ao VPP, que é influenciado pela prevalência da doença na população (Figura 5), sendo de esperar um VPP inferior na população em geral. Nas populações de baixo risco, ocorre uma proporção de falsos positivos maior entre as mulheres que realizam o teste, e um menor número de mulheres vai apresentar um feto afetado apesar de possuir um teste positivo. Portanto, o método de rastreio recomendado para a maioria das pessoas na população geral permanece o teste combinado convencional (com as vantagens adicionais inerentes à realização de uma ecografia detalhada no 1º trimestre).

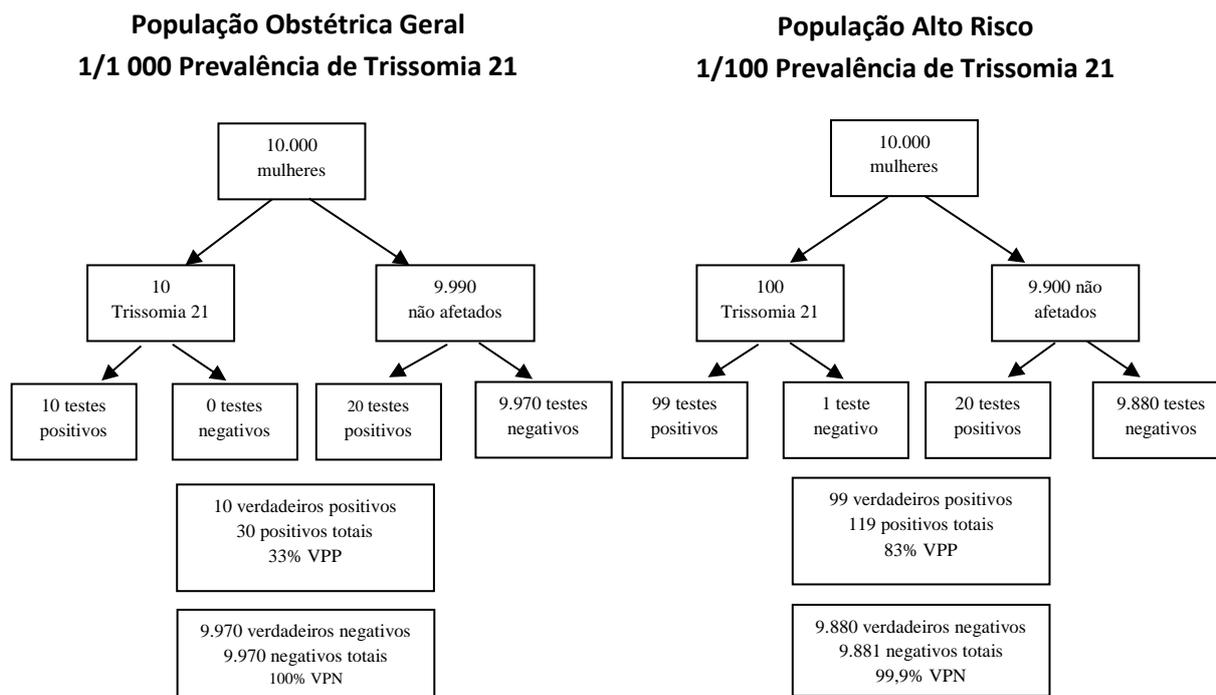


Figura 5. A importância da prevalência populacional no valor preditivo de um teste de rastreio: ilustração com ADN fetal livre. VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo. Adaptado de ACOG.Committee Opinion No. 640. Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy (2015).³⁸

No que diz respeito às gravidezes múltiplas, o risco de aneuploidia fetal depende do número de fetos e da corionicidade da gravidez e nenhum método de rastreio é tão eficiente nas gestações múltiplas como é na gestação unifetal. Apesar dos estudos preliminares sugerirem que o TPNNI terá eficácia semelhante à gravidez única, existe a necessidade de estudos mais abrangentes e prospectivos, e por isso, o uso de ADN fetal livre na pesquisa de aneuploidias nas gestações múltiplas não é ainda recomendado, rotineiramente.

A análise do ADN fetal livre não deteta anomalias do tubo neural ou da parede abdominal, logo o rastreio das mesmas deve ser realizado através da ecografia e das proteínas doseadas no soro materno.

Alguns laboratórios disponibilizam rotineiramente a detecção de outras anomalias além das aneuploidias mais comuns, como microdeleções ou trissomias mais raras (trissomia 16 ou

22). Essas anomalias adicionais rastreadas além de raras não possuem estudos clínicos validados, e por isso o seu rastreamento não deve ser encorajado, sendo mesmo desaconselhado.

3.5.13 Aplicações Futuras dos testes cfDNA

Além do rastreamento pré-natal de aneuploidia fetal, a análise sanguínea do cfDNA tem o potencial de detectar outras anomalias. Já foi possível determinar a existência de hemofilia, anemia de células falciformes e da β -talassémia. O teste de cfDNA tem também o potencial de identificar fetos com hiperplasia congênita das suprarrenais e determinar o genótipo Rh, e assim prever o risco da doença hemolítica do recém-nascido. A determinação do sexo é também possível numa idade gestacional precoce, com uma importância extrema quando existe o risco de doenças associadas ao sexo (e ao cromossoma X). Por outro lado, com a determinação sexual do feto surge a controvérsia da possibilidade da seleção fetal segundo o sexo por questões não médicas.^{2,27}

Com o advento da tecnologia de estudo por *microarray* inúmeras regiões do genoma foram caracterizadas, tendo estas impacto no fenótipo clínico quando duplicadas ou excluídas. Exemplos das consequências destas microdeleções na população pediátrica são o Síndrome de DiGeorge (causado pela microdeleção 22q11.2) ou o Síndrome Prader-Willi que resulta da microdeleção da região 15q11.2. Apesar da grande vantagem em detectar estas regiões do genoma até antes desconhecidas, ainda não se tem o total conhecimento para outras regiões afetadas, que são extremamente variáveis, logo sem que o seu resultado clínico seja previsível. Assim, ao aplicar esta tecnologia devemos apenas dirigir o estudo para sequências em que já se conheça o impacto clínico.¹⁵

Em doenças genéticas ou em pais que conheçam ser portadores de determinada mutação, a pesquisa no ADN fetal tem um elevado potencial para averiguar com certeza se o genoma fetal é também portador da mutação.

4. CONCLUSÃO

Desde a descoberta do ADN fetal livre na circulação materna, a área do diagnóstico pré-natal não invasivo tem sofrido inúmeras alterações, com um crescimento enorme quer na prática clínica quer na investigação de novas aplicações do mesmo. O diagnóstico pré-natal não invasivo é uma realidade que promete modificar a corrente prática do diagnóstico pré-natal.

O teste de rastreio com cfDNA tem uma alta sensibilidade e alta especificidade comprovadas, apesar de não ser um teste diagnóstico, devido às suas taxas ainda significativas de falsos positivos e negativos é um excelente teste de rastreio. A sua eficácia aliada à não invasividade fazem com que seja um teste de rastreio bastante ambicionado e pretendido pelas mulheres grávidas que pretendem conhecer quais os riscos que possuem de serem portadoras de fetos aneuploides.

O TPNNI é mais fidedigno na deteção do Síndrome de Down, no entanto na deteção de trissomia 18 e 13 apresenta taxas de deteção superiores às dos testes de rastreio atualmente implementados. A incapacidade do TPNNI em produzir um resultado, os chamados "*no calls*", implica que estes casos sejam orientados com alguma precaução, dado que podem representar um risco aumentado de aneuploidias como a trissomia 13 ou 18. A realização do TPNNI deve ser restrita à gravidez unifetal e num contexto de rastreio, e como tal nenhuma mulher deve tomar decisões definitivas baseada apenas no resultado isolado do teste.

O impacto real do TPNNI já se reflete na diminuição do número de testes invasivos realizados e consequentemente na redução do número de perdas fetais causadas pela técnica. A apreensão relacionada com a menor capacidade médica em realizar as técnicas invasivas, pela cada vez menor realização das mesmas, obriga a que medidas sejam tomadas para que tal não se verifique.

A área de diagnóstico pré-natal também se deve preparar para que com a vasta implementação do TPNNI existam profissionais preparados para fornecer às grávidas todo o aconselhamento pré e pós-teste exigido e recomendado pelas sociedades de Obstetrícia.

Sabe-se que o seu atual elevado custo não permite que seja implementado num modelo de rastreio primário, mas pode ser reservado como uma segunda linha a mulheres nas quais foi detetado, num rastreio pré-natal convencional (ecográfico e/ou bioquímico), um risco elevado de aneuploidia. É de prever que, com a expansão do teste e a sua aplicabilidade em grande escala se venha a verificar a redução dos custos, o que seguramente contribuirá para a sua instituição generalizada nos serviços de saúde. Na medida em que um dos objetivos deste trabalho era avaliar a possibilidade de implementar o teste não invasivo com recurso ao ADN fetal livre no Sistema Nacional de Saúde, conclui-se que apesar das suas excelentes potencialidades, o seu elevado custo faz com que ainda não seja possível oferecer à grávida no sistema público português. Contudo com a velocidade que se tem verificado as evoluções nesta área, o preço irá diminuir o suficiente ao ponto de que o custo não será um fator limitativo da sua aplicabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mercer BM. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2016;1-15. doi:10.1097/AOG.0000000000001406.
2. Tamminga S, van Maarle M, Henneman L, Oudejans CB, Cornel MC, Sistermans EA. Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing. *Adv Clin Chem.* 2016;74:63-102. doi:10.1016/bs.acc.2015.12.004.
3. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet (London, England).* 1969;1(7606):1119-1122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4181601>. Accessed November 4, 2016.
4. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood. Advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA.* 1993;270(19):2357-2361. doi:10.1001/jama.270.19.2357.
5. Leigh Simpson J, Elias S. Isolating fetal cells in the maternal circulation. *Hum Reprod Update.* 1995;1(4):409-418. doi:10.1093/humupd/1.4.409.
6. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(3):1453-1455. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/286330>. Accessed November 4, 2016.
7. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(9):3279-3283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2333281>. Accessed November 4, 2016.
8. Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaidis KH. Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am J Med Genet.* 1999;85(1):66-75.
9. Goldberg JD. Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of a rare event.

- Am J Hum Genet.* 1997;61(4):806-809. doi:10.1086/514889.
10. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn.* 1995;15(1):74-77. doi:10.1002/pd.1970150116.
 11. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 1993;2(1):43-50.
 12. Ganshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschik M, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immunol.* 1993;30(2-3):194-201.
 13. Price JO, Elias S, Wachtel SS, et al. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obs Gynecol.* 1991;165(6 Pt 1):1731-1737.
 14. Orsetti B, Lefort G, Boulot P, Andreo B, Pellestor F. Fetal cells in maternal blood: the use of primed in situ (PRINS) labelling technique for fetal cell detection and sex assessment. *Prenat Diagn.* 1998;18(10):1014-1022.
 15. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obs Gynecol.* 2013;6(2):48-62.
 16. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-487. doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
 17. #36: Prenatal aneuploidy screening using cell-free DNA. *Am J Obs Gynecol.* 2015;212(6):711-716. doi:10.1016/j.ajog.2015.03.043.
 18. Daley R, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis: progress and potential. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014;99(5):F426-30. doi:10.1136/archdischild-

- 2013-304828.
19. Wagner AJ, Mitchell ME, Tomita-Mitchell A. Use of cell-free fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal screening. *Clin Perinatol.* 2014;41(4):957-966. doi:10.1016/j.clp.2014.08.013.
 20. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-775. doi:10.1086/301800.
 21. Benn P, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obs Gynecol.* 2013;42(1):15-33. doi:10.1002/uog.12513.
 22. Brar H, Wang E, Struble C, Musci TJ, Norton ME. The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(2):143-145. doi:10.3109/14767058.2012.722731.
 23. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, et al. The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn.* 2016;36(4):304-311. doi:10.1002/pd.4780.
 24. Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obs Gynecol.* 2014;211(5):527.e1-527.e17. doi:10.1016/j.ajog.2014.08.006.
 25. Revello R, Sarno L, Ispas A, Akolekar R, Nicolaides KH. Screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood: consequences of a failed result. *Ultrasound Obs Gynecol.* 2016;47(6):698-704. doi:10.1002/uog.15851.
 26. Chiu RW, Lo YM. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(1):197-204. doi:10.1515/cclm-2012-0601.

27. Chiu RW. Noninvasive prenatal testing by maternal plasma DNA analysis: current practice and future applications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2014;244:42-48. doi:10.3109/00365513.2014.936681.
28. Cuckle H, Benn P, Pergament E. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy as a clinical service. *Clin Biochem.* 2015;48(15):932-941. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.02.011.
29. Bianchi DW, Wilkins-Haug L. Integration of noninvasive DNA testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road? *Clin Chem.* 2014;60(1):78-87. doi:10.1373/clinchem.2013.202663.
30. Wilson J, Jungner Y. Principles and practice of screening for disease. *World Heal Organ.* 1968;65(4):281-393. doi:10.1001/archinte.1969.00300130131020.
31. Yaron Y. The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon. *Prenat Diagn.* 2016;36(5):391-396. doi:10.1002/pd.4804.
32. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2016;6(1):e010002. doi:10.1136/bmjopen-2015-010002.
33. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH, et al. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obs Gynecol.* 2015;45:249-266. doi:10.1002/uog.14791.
34. Vanstone M, King C, de Vrijer B, et al. Non-invasive prenatal testing: ethics and policy considerations. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014;36(6):515-526. doi:10.1016/S1701-2163(15)30568-5.
35. Long AA, Abuhamad AZ, Warsof SL. Modifying Risk of Aneuploidy with a Positive

- Cell-Free Fetal DNA Result. *Clin Lab Med.* 2016;36(2):249-259.
doi:10.1016/j.cll.2016.01.018.
36. Soothill P, Lo Y. Non-invasive prenatal testing for chromosomal abnormality using maternal plasma DNA. *Sci Impact Pap.* 2014;(15).
37. SMFM Statement: clarification of recommendations regarding cell-free DNA aneuploidy screening. *Am J Obs Gynecol.* 2015;213(6):753-754.
doi:10.1016/j.ajog.2015.09.077.
38. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion No. 640: Cell-Free Dna Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2015;126(3):e31-7.
doi:10.1097/AOG.0000000000001051.
39. Benn P, Borell A, Chiu R, et al. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):622-629. doi:10.1002/pd.4139.
40. Glenn E Palomaki, PhD, Geryl M Messerlian, PhD, Jacquelyn V Halliday M. Prenatal screening for common aneuploidies using cell-free DNA - UpToDate. https://www.uptodate.com/contents/prenatal-screening-for-common-aneuploidies-using-cell-free-dna?source=search_result&search=cell free DNA&selectedTitle=1~58.
Published 2016.
41. Hahn S, Hosli I, Lapaire O. Non-invasive prenatal diagnostics using next generation sequencing: technical, legal and social challenges. *Expert Opin Med Diagn.* 2012;6(6):517-528. doi:10.1517/17530059.2012.703650.
42. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):972-979.
doi:10.1002/pd.4601.
43. Larion S, Warsof SL, Romary L, Mlynarczyk M, Peleg D, Abuhamad AZ. Uptake of

- noninvasive prenatal testing at a large academic referral center. *Am J Obs Gynecol*. 2014;211(6):651.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2014.06.038.
44. Willems P, Dierickx H. The first 3,000 Non-Invasive Prenatal Tests (NIPT) with the Harmony test in Belgium and the Netherlands. *Facts, views Vis* 2014;6(1):7-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4086005/>.
45. Manegold-Brauer G, Bellin AK, Hahn S, et al. A new era in prenatal care: Non-invasive prenatal testing in Switzerland. *Swiss Med Wkly*. 2014;144. doi:10.4414/smw.2014.13915.
46. Langlois S, Brock J-A, Genetics Committee, et al. Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Canada JOGC = J d'obstétrique gynécologie du Canada JOGC*. 2013;35(2):177-183. doi:10.1016/S1701-2163(15)31025-2.