

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Alexandra Maria dos Santos

**DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NÃO INVASIVO**  
**SEQUENCIAÇÃO DE NOVA GERAÇÃO**

Relatório de estágio no âmbito do mestrado em Bioquímica, orientada pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira e pela Professora Doutora Cármen Alpoim, apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologias no Departamento de Ciências da Vida.

Outubro de 2021



Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Departamento das Ciências da Terra

# Diagnóstico pré-natal não invasivo

Sequenciação de Nova Geração

Trabalho realizado por: Alexandra Maria dos Santos  
Número de aluno: 2019167171

Mestrado em Bioquímica

Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

Orientadora externa: Prof. Doutora Isabel Carreira  
Orientadora interna: Prof. Doutora Cármen Alpoim  
Tutor de laboratório: Dr. Miguel Pires

Outubro de 2021

## Resumo

O diagnóstico pré-natal combina um conjunto de testes realizados durante a gestação de modo a detetar possíveis complicações na formação do embrião. As técnicas usadas dividem-se em invasivas e não invasivas, sendo o foco deste trabalho a recolha e análise do *cell free fetal DNA* (cffDNA) livre em circulação no sangue materno, uma técnica não invasiva que permite, através de técnicas de Sequenciação de Nova Geração (NGS), analisar vários parâmetros como a presença de aneuploidias, o sexo fetal, e o genótipo RhD, evitando em cerca de 90% o uso de técnicas de diagnóstico invasivas, associadas a perda fetal.

Atualmente, as aneuploidias que surgem com maior taxa de incidência são as ligadas aos cromossomas somáticos 13, 18, 21 e as ligadas aos cromossomas sexuais. Existem vários fatores que podem levar ao aparecimento destas alterações numéricas, sendo por isso importante a implementação de técnicas que permitam detetá-las ainda numa fase precoce, como é o caso do cffDNA que pode ser realizado logo após as 10 semanas de gestação.

Técnicas NGS possibilitam a sequenciação do cell free DNA materno e fetal, por comparação é calculada a fração fetal que permite saber se o feto é, ou não, portador de uma das aneuploidias em estudo.

Palavras-Chave: Diagnóstico não invasivo; Aneuploidias; cell-free DNA; Next Generation Sequencing; fração fetal.



## **Abstract**

Prenatal diagnosis combines a set of tests performed during pregnancy in order to detect possible complications in the embryo formation. The techniques used are divided into invasive and non-invasive. The focus of this work was the collection and analysis of cell free fetal DNA (cffDNA) found in the maternal blood, as a non-invasive technique allowing, through Next Generation Sequencing (NGS) techniques, the analysis of several parameters such as the presence of aneuploidies, fetal sex and RhD genotype, avoiding around 90% the use of invasive diagnostic techniques, associated with fetal loss.

Currently, the aneuploidies which appear with the highest incidence rate are those linked to somatic chromosomes 13,18, 21 and those linked to sex chromosomes. There are several factors that may lead to the appearance of these numerical changes, which is why it is important to implement techniques that allow detecting them at an early stage, such as cffDNA that can be performed right after 10 weeks of gestation.

NGS techniques allow the sequencing of maternal and fetal cell free DNA and, by comparison, the fetal fraction is calculated and it is possible to know if the fetus is, or is not, a carrier of one of the aneuploidies under study.

Keywords: Non-invasive diagnosis; Aneuploidies; Cell-free DNA; Next generation sequencing; fetal fraction.



## Agradecimentos

Venho desta forma exprimir o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma permitiram que esta tese se concretizasse.

Queria começar por agradecer a todos os meus professores da licenciatura em Biotecnologia na Escola Superior Agrária de Coimbra, por me terem dado bases para prosseguir no meu ciclo de estudos.

Agradeço também a professora Paula Veríssimo, não só por ter feito a apresentação do curso, suscitando em mim curiosidade pelo mesmo, como também por me ter dado a oportunidade de o integrar como aluna de Mestrado.

Um forte agradecimento também à professora Isabel Carreira, da unidade curricular de Genética Humana por ter despoletado em mim interesse pela sua área e por me ter dado a oportunidade de fazer estágio no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, do qual é diretora.

Deixo também um grande obrigado ao Dr. Luís Miguel Pires, que me acompanhou durante toda a minha estadia no laboratório, mostrando sempre muita disponibilidade para me ajudar durante todo o ano não só nas técnicas em laboratório como no esclarecimento de dúvidas para a elaboração desta tese.

Não quero ainda deixar de agradecer à professora Ilda Ribeiro, por de alguma forma ir sempre mantendo o contacto e mostrando a sua disponibilidade para ajudar.

Obrigada também aos restantes elementos do laboratório, por me terem recebido sempre com muita simpatia.

Por último, mas não menos importante, venho agradecer também aos meus familiares e amigos, que de alguma forma sempre estiveram presentes ao longo de todo o meu percurso académico, e que de certa forma contribuíram para que a minha passagem pela cidade de Coimbra tenha sido algo bastante marcante na minha vida.



# Índice

1. Introdução.....	19
1.1 Diagnóstico pré-natal não invasivo .....	19
1.2 DNA fetal livre no sangue materno .....	20
1.2.1 Determinação do sexo fetal .....	21
1.2.2 Determinação do genótipo RhD .....	22
1.2.3 Deteção de aneuploidias.....	22
1.2.3.1 Síndrome de Patau.....	22
1.2.3.2 Síndrome de Edwards .....	23
1.2.3.3 Síndrome de Down .....	23
1.2.3.4 Síndrome de Turner.....	24
1.2.3.5 Síndrome de Klinefelter .....	25
1.2.3.6 Síndrome do Triplo X.....	25
1.2.3.7 Síndrome de Jacobs.....	26
1.2.4 Origem das aneuploidias .....	26
1.2.4.1 Trissomia livre .....	26
1.2.4.2 Translocação robertsoniana .....	27
1.2.4.3 Mosaicismo .....	29
1.3 Next generation sequencing .....	30
1.4 Viabilidade económica.....	35
1.5 Impacto populacional.....	37
1.6 Vantagens e desvantagens .....	39
2. Objetivos.....	41
3. Metodologia .....	41
3.1. Recolha da amostra .....	41
3.2. Isolamento e congelamento do plasma .....	42
3.3 Extração do cell free DNA .....	42
3.4 Controlo de qualidade do cfDNA extraído.....	43
3.5 Preparação das bibliotecas .....	43
3.5.1 PCR multiplex .....	43
3.5.2 PCR universal.....	44
3.5.3 Controlo de Qualidade da Biblioteca .....	45
3.5.4 Purificação .....	45
3.5.5 Pooling.....	47
3.6 Sequenciação .....	47



3.7 Análise de dados.....	50
4. Resultados.....	52
5. Conclusão.....	58
Bibliografia.....	60



## Índice de Ilustrações:

### Figuras

Figura 1 – Imagem representativa de crianças portadoras de trissomia 13, 18 e 21, respectivamente .....	24
Figura 2 - Esquema representativo de uma divisão meiótica normal, de uma não disjunção dos cromossomas em meiose I e de uma não disjunção em meiose II .....	27
Figura 3 – Esquema representativo de uma translocação robertsoniana entre os cromossomas 13 e 21, com a junção dos braços longos de ambos os cromossomas e perda dos braços curtos. ....	28
Figura 4 - Formação de gâmetas de um indivíduo portador de uma translocação Robertsoniana entre os cromossomas 14 e 21. Este indivíduo poderá dar origem a 6 tipos de gametas diferentes entre os quais 2 representam origem de uma trissomia e 2 são inviáveis (monossomia).....	29
Figura 5 - Representação dos vários tipos de mosaicismo durante a gestação. Este tipo de condição pode estar ligado apenas à placenta, apenas ao embrião ou de forma generalizada. ....	30
Figura 6 - Distribuição do número total de genes por cada cromossoma .....	32
Figura 7 - Imagem representativa da presença de um SNP numa sequência de DNA	33
Figura 8 - Margem de valores praticados pela realização do teste NIPT em diferentes países do mundo, incluindo Portugal. ....	35
Figura 9 – Evolução da fertilidade de uma mulher ao longo dos anos, na qual se pode verificar um decréscimo acentuado da mesma após os 35 anos. ....	37
Figura 10 - Tópicos a serem tratados durante as consultas de aconselhamento e a importância dada por cada país.....	39
Figura 11 - Método de extração por vácuo.....	42
Figura 12 - Adição de tags através de primers específicos aos fragmentos de interesse .....	44
Figura 13 - Adição de barcodes nas extremidades dos fragmentos de interesse.....	44
Figura 14 - Corrida de eletroforese em gel de agarose .....	45
Figura 15 - Processo de purificação através de beads magnéticas.....	46
Figura 16 - Processo de purificação através do uso de beads magnéticas .....	46
Figura 17 - Sequenciador Miseq da Illumina .....	48
Figura 18 - Lote de reagentes usado para sequenciação e flowcell onde se vão ligar as bibliotecas a serem sequenciadas. ....	48
Figura 19 - Ligação dos amplicões à flowcell através dos adaptadores previamente adicionados. ....	49



Figura 20 - Sequenciação através de síntese e emissão de fluorescência aquando a ligação dos nucleótidos Ligação dos amplicões à flowcell através dos adaptadores previamente adicionados. ....	49
Figura 21 – Relatório de um resultado NIPT após a análise de dados.....	51
Figura 22 - Conjunto dos resultados inconclusivos representados num diagrama de Venn .....	56

### **Tabelas**

Tabela I - Tipos de diagnóstico pré-natal .....	19
Tabela II -- Representação da tabela excel usada para cálculo dos volumes a adicionar de cada amostra .....	47

### **Gráficos**

Gráfico I - Resultados NIPT .....	52
Gráfico II - Percentagem da FF relativamente aos resultados inconclusivos.....	53
Gráfico III - IMC das restantes cujo resultado NIPT foi inconclusivo .....	54
Gráfico IV - Qualidade das amostras referentes aos resultados inconclusivos.....	55



## Lista de abreviaturas e siglas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cfDNA	<i>Cell free DNA</i>
NIPT	<i>Non-invasive pre-natal test</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
DPN	Diagnóstico pré-natal
cffDNA	<i>Cell free fetal DNA</i>
FF	Fração fetal
IMC	Índice de massa corporal
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
MPS	<i>Massive parallel sequencing</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
TE	Tampão de eluição
TN	Translucência nugal
IMG	Interrupção médica da gravidez
ST	Síndrome de Turner
SD	Síndrome de Down
LCG-FMUC	Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



# 1. Introdução

## 1.1 Diagnóstico pré-natal não invasivo

O diagnóstico pré-natal combina um conjunto de testes, invasivos e não invasivos, que têm como objetivo detetar anomalias congénitas que se possam manifestar quer logo á nascença como mais tardiamente. Contudo, antes do desenvolvimento destas tecnologias não havia maneira de controlar o desenvolvimento do feto durante a gestação. Hoje em dia, com os avanços das tecnologias, desenvolveram-se inúmeros exames que são realizados durante toda a gestação como forma, não só de controlar o desenvolvimento do feto, como de prevenir o nascimento de fetos com malformações graves, algumas incompatíveis com a vida (Miragaia *et al.*, 2020).

Dentro dos exames executados estes podem ser de carater invasivo ou não invasivo:

*Tabela I - Tipos de diagnóstico pré-natal*

<p><b>Métodos invasivos</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biópsia das vilosidades coriônicas;</li> <li>- Amniocentese;</li> <li>- Cordocentese;</li> <li>- Embrioscopia ou fetoscopia.</li> </ul>
<p><b>Métodos não invasivos</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batimento cardíaco fetal;</li> <li>- Ecografia;</li> <li>- Processos de caracterização bioquímica</li> <li>- Exames externos (ex: observação do útero, pesagem, medição da tensão, etc);</li> <li>- Obtenção de DNA fetal livre em circulação no sangue materno;</li> <li>- Diagnóstico genético pré- implantatório;</li> </ul>

O objetivo principal da aplicação dos testes mencionados na tabela 1 é conseguir detetar a presença de anomalias. A possibilidade de prever atempadamente a presença de uma aneuploidia permite que os progenitores possam ser devidamente informados sobre as possíveis complicações que o feto poderá apresentar ao nascimento, sendo ainda oferecida a possibilidade de uma interrupção médica da gravidez (IMG), mesmo que a anomalia detetada não seja incompatível com a vida, como por exemplo a Síndrome de Down (SD). (Bernal and López, 2014)

Durante a gestação, as grávidas são sujeitas a alguns testes de rastreio mais simples, como é o caso da ecografia que está incluída nos testes não invasivos e que por norma é realizada três vezes em cada gestação, uma por trimestre. No entanto, existem outros exames de carácter invasivo, que podem ser realizados tendo em conta vários fatores como: a idade materna avançada, o historial familiar, gestações anteriores cujo feto era portador de alguma anomalia genética e/ou achados por imagiologia que indiquem algum risco de anomalia cromossómica, tais como translucência nucal aumentada, presença ou ausência do osso nasal e a frequência cardíaca fetal. (Romão *et al.*, 2012) (Kozma, 2014) (Almeida *et al.*, 2014)

## 1.2 DNA fetal livre no sangue materno

Existem várias técnicas de diagnóstico pré-natal não invasivo, no entanto, o foco deste trabalho foi o uso de *cell free DNA* (cffDNA), como meio de rastreio das aneuploidias mais comuns envolvendo os cromossomas 13, 18 e 21.

Normalmente, qualquer indivíduo apresenta DNA livre em circulação no seu sangue que advém das suas próprias células que sofreram apoptose ou necrose, processo biológico que representa a morte celular programada ou a morte causada por uma lesão, respetivamente. No caso de uma gestante, além do cfDNA proveniente do seu genoma devido aos processos biológicos referidos anteriormente, foi descoberto em 1997 a existência de cfDNA fetal em circulação materna, proveniente do trofoblasto e da placenta, denominado de cffDNA. A extração de DNA fetal a partir de sangue materno e sua respetiva análise permite, com recurso a tecnologias de nova geração, calcular o risco de ocorrência de aneuploidias. (Soediono, 2014) (Smet, Scott and McLennan, 2020) (Hu *et al.*, 2021)

É possível detetar cffDNA na circulação materna entre as 5 e as 9 semanas de gestação numa percentagem que varia entre 5 a 10% da totalidade de DNA livre, aumentando de forma proporcional ao tempo de gestação. No entanto, existem fatores

que podem alterar estes valores, como é o caso de gestantes fumadoras, onde a percentagem de cfDNA é mais elevada devido à necrose das células placentárias, ou mulheres com o índice de massa corporal elevado, onde existe uma sub-representação do material genético proveniente do feto. (Martinhago *et al.*, 2006)

Além de ser uma técnica não invasiva, esta permite avaliar determinados parâmetros como a determinação do sexo fetal, o genótipo *RhD* e a deteção de aneuploidias.

### 1.2.1 Determinação do sexo fetal

A fase mais precoce do desenvolvimento fetal não está dependente de hormonas e por isso não se verifica ainda uma diferenciação sexual. No entanto, após as 6 semanas de gestação, inicia-se a atividade de determinados genes que perpetuam o desenvolvimento da genitália masculina, como é o caso do *SRY* que regula a expressão do gene *SO9*, levando à formação da genitália masculina e a uma repressão da formação da genitália feminina através da regulação positiva da hormona anti-mulleriana (AMH). No entanto, em 1990, descobriu-se que este processo é bem mais complexo e que, existe uma pequena janela temporal para que o gene *SRY* inicie a sua atividade de forma a ativar o gene *SOX9*, caso contrário é iniciada a formação da genitália feminina. (Smet, Scott and McLennan, 2020) (Rey, Josso and Racine, 2020)

É possível determinar o sexo fetal através da identificação de sequências específicas do cromossoma Y, como genes *SRY* e *DYS1424*. A técnica mais usada para identificar estes genes no plasma materno é a reação de polimerase em cadeia, mais conhecida por *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. (D'Aversa *et al.*, 2018) (Marques, 2012)

Também é possível detetar o sexo fetal através de ecografia, no entanto, só a partir das 12 semanas de gestação se torna possível visualizar os órgãos sexuais externos. E ainda assim, os resultados obtidos podem-se mostrar ambíguos ou inconclusivos. (Rodríguez *et al.*, 2015) (Finning and Chitty, 2008)

Apesar de possível, a determinação do sexo fetal através do teste NIPT não é o principal objetivo da técnica, mas pode ser relevante o uso desta técnica na determinação do sexo fetal como meio de ligação a possíveis doenças ligadas ao sexo. Nestes casos, se for possível detetar este tipo de doenças através deste teste, deixará de ser necessário aplicar técnicas de DPN invasivo para o mesmo efeito. (Martinhago *et al.*, 2006)

### 1.2.2 Determinação do genótipo *RhD*

Outra aplicação desta técnica é a determinação do Genótipo *RhD* fetal, onde se usa o PCR para amplificar sequências do gene *RhD* em grávidas *RhD* negativo. Se este gene se encontrar sobreexpresso significa que o feto é *RhD* positivo, o que poderá despoletar uma doença hemolítica fetal caso a mãe não tenha sido previamente sensibilizada. (Chiu, Hui and Chiu, 2018)

### 1.2.3 Detecção de aneuploidias

A deteção de aneuploidias, através da quantificação de cffDNA, com recurso à técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS), apresenta atualmente uma sensibilidade de cerca de 99%, sendo que em apenas 1% das vezes apresenta resultados de falsos positivos, falsos negativos ou inconclusivos. (Kotsopoulou *et al.*, 2015)

Atualmente, este teste é dirigido para detetar aneuploidias cuja taxa de incidência é relativamente elevada em relação às restantes, como é o caso das trissomias dos cromossomas 13, 18, 21 e, em alguns casos, as aneuploidias ligadas aos cromossomas sexuais. Estas aneuploidias têm origem em erros genéticos que acontecem antes, ou depois da formação do zigoto, podendo estar relacionados com a não disjunção dos cromossomas quer na meiose I, como na meiose II, podendo também estar associada a translocações Robertsonianas ou a casos de mosaicismo.

Os portadores das aneuploidias em estudo apresentam um conjunto de características fenotípicas ao qual se dá o nome de síndrome.

#### 1.2.3.1 Síndrome de Patau

A trissomia do cromossoma 13, ou síndrome de Patau em homenagem ao geneticista Klaus Patau, é a menos comum, com uma taxa de incidência de 1/8.000 e 1/15.000 nascimentos, devido à elevada taxa de aborto durante a gestação, rondando os 95%.

Em 90% dos casos, a síndrome de Patau surge devido a um cromossoma 13 extra, que teve origem numa não disjunção meiótica (trissomia livre), no entanto, como

se trata de um cromossoma acrocêntrico, a causa poderá ainda resultar de uma translocação Robertsoniana. (*Trisomi 13-syndromet - Socialstyrelsen*, 2008)

Portadores desta trissomia apresentam malformações do sistema nervoso central, dimorfismo facial, anomalias oculares, polidactilia pós-axial, malformações viscerais e atraso psicomotor grave. A nível neurológico, apresentam hipotonia e hiporeatividade. Em 70% dos casos é ainda possível observar holoprosencefalia que resulta num defeito aquando a divisão a nível cerebral. Em relação às características faciais, estas são variáveis, podendo apresentar hipertelorismo e agenesia pré-maxilar, a cebocefalia ou ciclopia com ausência do esqueleto nasal, fenda do lábio/palato, pescoço curto, os olhos são pequenos e afastados quando o indivíduo não sofre de anoftalmia (ausência de um ou ambos os olhos), regiões de aplasia occipital cutânea, polidactilia pós-axial (quantidade anómala de dedos quer nas mãos como nos pés), malformações cardíacas e malformações urogenitais. (*Síndrome de Patau*, 2014) (Kuznetsova *et al.*, 2015) (Verloes, 2008)

#### 1.2.3.2 Síndrome de Edwards

A trissomia do cromossoma 18 ou Síndrome de Edwards, descrita em 1960 pelo geneticista Jonh Hilton Edwards, está associada à presença de 3 cromossomas 18 e a sua taxa de incidência na Europa é de 1 por cada 2700 nascidos vivos. Esta síndrome tem origem num erro pré-zigótico aquando da formação das gametas, sendo que a probabilidade de ocorrer aumenta com o avanço da idade materna e ronda os 0,1-0,2%. Estima-se que a maioria das crianças portadoras desta síndrome não chegue a completar um ano de vida. (*Trisomi 18-syndromet - Socialstyrelsen*, 2015)

As características fenotípicas presentes incluem: atraso no desenvolvimento psicomotor, defeitos cardíacos, osso occipital muito alongado, micrognatia, pescoço curto, orelhas anormais e com poucos sulcos, boca pequena e triangular, grande distância intermamilar, genitais externos anómalos, dedo indicador maior que os restantes e flexionado, pés com as plantas arqueadas e as unhas hipoplásticas e atrofiadas. (*Edwards' syndrome (trisomy 18) - NHS - NHS*, 2020) (Cereda and Carey, 2012) (Roche, 2005)

#### 1.2.3.3 Síndrome de Down

A síndrome de Down ou trissomia 21 é a anomalia cromossômica mais comum com uma taxa de incidência de 1 a cada 750 nascimentos. Contudo, com o avanço da idade materna a prevalência desta síndrome tem tendência a aumentar, podendo chegar a 1 por cada 100 nascidos vivos quando a progenitora tem 40 ou mais anos.

Na maioria dos casos, esta anomalia ocorre devido a uma não disjunção meiótica, sendo também possível que ocorra devido a uma translocação Robertsoniana num dos progenitores, ou associado a mosaïcismo.

Portadores desta trissomia apresentam características como occipital achatado, malformações viscerais, atraso mental, microcefalia, pescoço curto com pele redundante na nuca, a boca geralmente permanece aberta, orelhas pequenas e arredondadas, mãos curtas e largas, anomalias dentárias e manchas de *brushfield*. Após o nascimento, se existir um acompanhamento precoce é possível atenuar alguns sintomas através da fisioterapia, terapia da fala e psicomotricidade. (Kozma, 2014) (Chung, 2018) (*Orphanet: Trissomia 21*, 2000)



Figura 1 – Imagem representativa de crianças portadoras de trissomia 13, 18 e 21, respetivamente

(Fonte: Manual MSD: Versão saúde para a família)

Para além das aneuploidias ligadas aos cromossomas somáticos, podem surgir também aneuploidias que envolvem os cromossomas sexuais, podendo nestes casos não só existir a presença de trissomias, como de monossomias.

#### 1.2.3.4 Síndrome de Turner

A Síndrome de Turner (ST), descrita por Ullrich em 1930 e documentada 8 anos depois por Henry H. Turner, representa o único tipo de monossomia compatível com a vida. É caracterizada pela falta total ou parcial de um cromossoma X. Os indivíduos afetados são sempre do sexo feminino e o seu cariótipo é 45,X, sendo que a sua

incidência é de 1 para 5000 nascimentos, aumentando de 1 para 2500 quando nos restringimos apenas ao sexo feminino. A ST pode surgir devido a uma não disjunção meiótica durante a gametogênese, no entanto, poderá também estar relacionada com uma perda cromossômica durante as divisões mitóticas iniciais durante a formação do feto ou um cromossoma X anormal. Por norma, a ST representada pela total falta do cromossoma X em todas as células representa cerca de 50% dos casos, sendo que os casos de mosaicismo representam 25%. (Cabrol, 2007) (Cui *et al.*, 2018) (Bonis *et al.*, 2019)

As portadoras de ST podem apresentar características como anomalias cardiovasculares, problemas renais, anomalias oculares, problemas na audição, alterações ao nível da pele, doenças autoimunes, tórax largo, baixa estatura, espaçamento acentuado entre os mamilos, ausência do desenvolvimento mamário e infertilidade. No entanto algumas destas características podem ser atenuadas com a ajuda de terapias hormonais. (Trovó De Marqui, 2015) (Kesler, 2007)

#### 1.2.3.5 Síndrome de Klinefelter

A Síndrome de Klinefelter (SK) foi primeiramente descrita por Harry Fitch Klinefelter em 1942. Os indivíduos portadores desta síndrome possuem um cromossoma X extra, a maioria devido a uma não disjunção meiótica na formação dos gametas de um dos progenitores, apresentando um cariótipo 47,XXY.

A incidência desta síndrome é de 1 a cada 500 nascidos vivos, por norma estes indivíduos apresentam testículos reduzidos o que pode levar a uma produção diminuída de testosterona, resultando em azoospermia e atrofia testicular. Podem também apresentar seios desenvolvidos, massa muscular reduzida e poucos pêlos. Podem ainda apresentar distúrbios da fala e dificuldades na aprendizagem. (Nieschlag, 2013) (Lanfranco *et al.*, 2004) (Powell-Hamilton, 2018)

#### 1.2.3.6 Síndrome do Triplo X

Esta é a anomalia cromossômica mais comum entre a população do sexo feminino, com uma incidência de 1 para 1000 nascimentos, apresentando um cariótipo 47,XXX. No entanto, como grande parte dos portadores desta síndrome é assintomática, estima-se que apenas 10% sejam diagnosticados. A grande causa do aparecimento desta síndrome está relacionada com a não disjunção durante a meiose, no entanto em cerca de 20% dos casos este erro pode ser pós-zigótico. As portadoras desta síndrome

são normalmente mulheres de estatura alta, com os seios e a genitália subdesenvolvida podendo apresentar atraso mental. Apesar disso, geralmente estas mulheres são férteis e não apresentam características fenotípicas anormais. (Otter, Schrandner-Stumpel and Curfs, 2010) (Howell *et al.*, 2010)

#### 1.2.3.7 Síndrome de Jacobs

A síndrome de Jacobs, cujos portadores são do sexo masculino, é definida pela presença de um cromossoma Y a mais que o normal. Estima-se que a incidência desta síndrome seja de 1 a cada 1000 indivíduos do sexo masculino. Esta, por norma, surge devido a um erro na meiose II aquando a formação dos gametas por parte do progenitor paterno, no entanto em raros casos poderá ser resultado de mosaicismo. Estes homens apresentam uma estatura acima da média e podem apresentar um crescimento mais acelerado durante a infância. Contudo, são fenotipicamente normais. (Re and Birkhoff, 2015) (Bardsley *et al.*, 2013) (*Jacobs Syndrome - PubMed*, 2020) (Sood and Clemente Fuentes, 2021)

#### 1.2.4 *Origem das aneuploidias*

As características referidas anteriormente relativamente às aneuploidias mencionadas são algumas das características que podem ser notadas nos indivíduos portadores destas trissomias, mas como é que elas surgem?

##### 1.2.4.1 Trissomia livre

Maioritariamente, este tipo de trissomias surge derivado a uma não disjunção meiótica aquando a formação dos gametas (Fig.2), que originam oócitos ou espermatozoides cujo número de cromossomas está alterado, podendo ter no geral um cromossoma a mais ou a menos.

No caso das mulheres, estudos indicam que esta falha na divisão meiótica pode estar relacionada com fatores externos, tais como uma idade avançada ( $\geq 35$  anos). Ray e a sua equipa (2018) corroboram esta afirmação, referindo que problemas associados a uma não disjunção meiótica na meiose I são detetados mais

frequentemente em mães mais jovens, enquanto que problemas na meiose II são mais frequentes em mulheres mais velhas. (Ray *et al.*, 2018)

A uma trissomia originada por uma não disjunção meiótica dá-se o nome de trissomia livre.

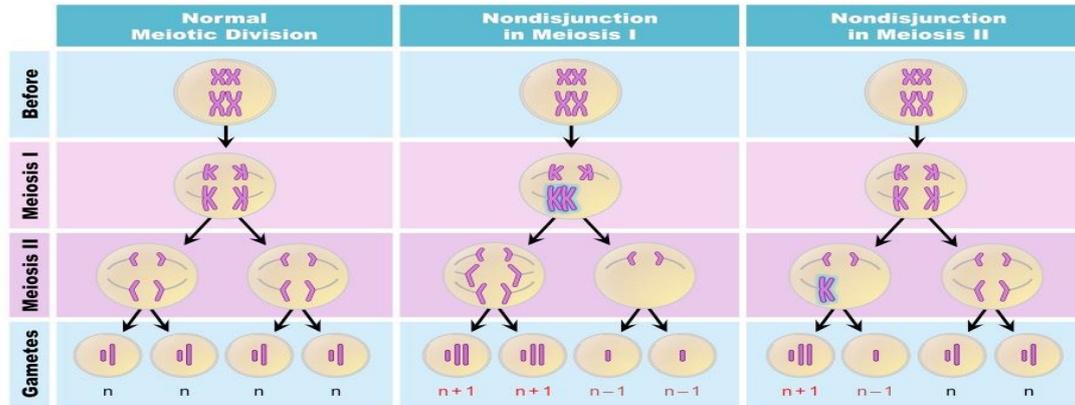


Figura 2 - Esquema representativo de uma divisão meiótica normal, de uma não disjunção dos cromossomas em meiose I e de uma não disjunção em meiose II

(Fonte: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/33-meiosis/non-disjunction.html>)

#### 1.2.4.2 Translocação robertsoniana

Um dos mecanismos biológicos que pode estar associado com o aparecimento de aneuploidias são as translocações Robertsonianas.

As translocações representam, na sua maioria, trocas de fragmentos entre cromossomas não homólogos, chamadas de translocações recíprocas. Porém, existe um outro tipo de translocação, a Robertsoniana, que envolve os cromossomas acrocêntricos (13,14,15, 21 e 22), e representa o rearranjo cromossómico estrutural mais comum na espécie humana. Neste tipo de translocação, o mecanismo de formação associado envolve a quebra a nível do centrómero que se encontra bastante perto da extremidade do cromossoma. Quando isso acontece, normalmente, os fragmentos do braço curto de ambos os cromossomas envolvidos acabam por se perder devido à ausência de centrómero, e os braços longos ligam-se. Os portadores deste rearranjo apresentam um cariótipo com 45 cromossomas e, por norma não apresentam qualquer

alteração fenotípica e grande parte apenas toma conhecimento da sua situação quando decidem dar início à parentalidade. (Zhao *et al.*, 2015) (Wiland *et al.*, 2020) (Delhanty, 2018)

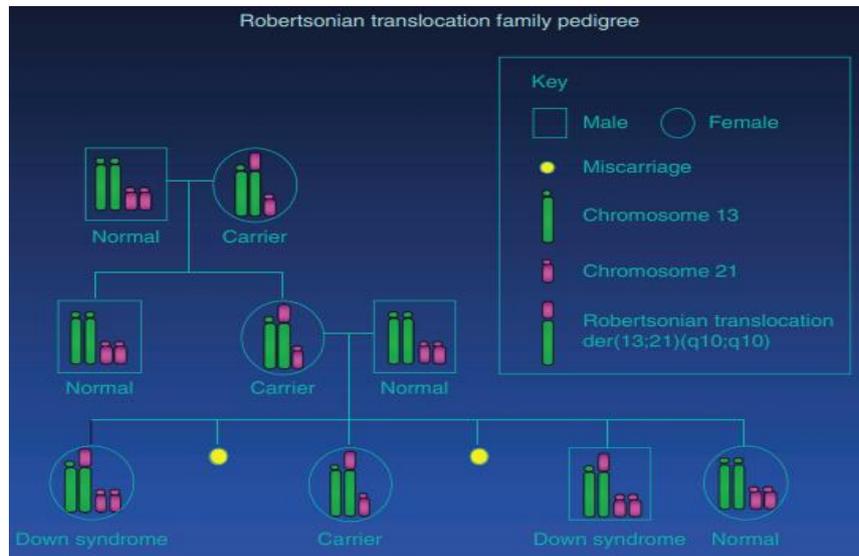


Figura 3 – Esquema representativo de uma translocação robertsoniana entre os cromossomas 13 e 21, com a junção dos braços longos de ambos os cromossomas e perda dos braços curtos.

(Fonte: Delhanty 2018 )

A maioria das síndromes derivadas deste rearranjo cromossômico estrutural acontece quando um dos progenitores é portador de uma translocação Robertsoniana que, durante o processo de gametogénese irá formar seis tipos diferentes de gâmetas que, ao fecundarem com um gâmeta normal, poderá dar origem a: descendência com complemento cromossômico normal, descendência portadora dessa translocação (sem que isso afete o seu fenótipo) e descendência portadora de trissomia. Pode ainda dar origem a zigotos com monossomia, que geralmente não são viáveis (Fig.4). (Song *et al.*, 2016)

Por outro lado, este tipo de anomalia poderá surgir *de novo*, isto é, quando ambos os progenitores apresentam um cariótipo normal, mas o descendente é portador de uma translocação Robertsoniana. Por norma, estas translocações *de novo* têm origem em erros na meiose I da oogénese. (Zhao *et al.*, 2015)

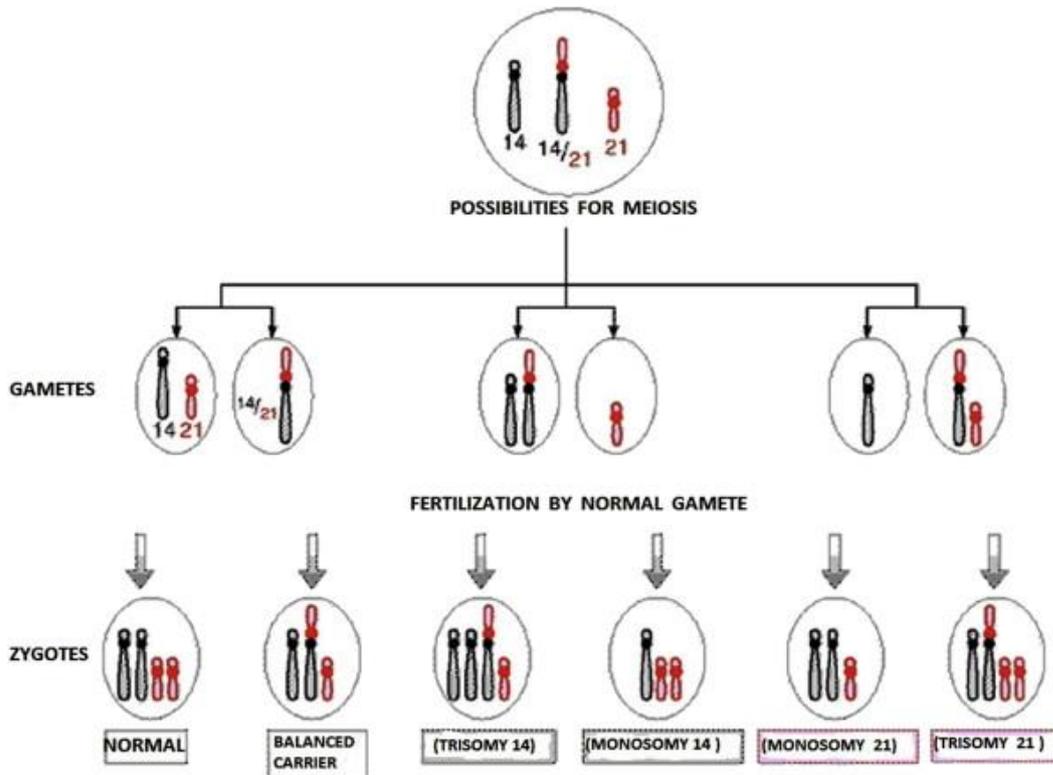


Figura 4 - Formação de gâmetas de um indivíduo portador de uma translocação Robertsoniana entre os cromossomas 14 e 21. Este indivíduo poderá dar origem a 6 tipos de gametas diferentes entre os quais 2 representam origem de uma trissomia e 2 são inviáveis (monossomia).

(Fonte: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-3673-3\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-3673-3_12))

#### 1.2.4.3 Mosaicismo

As aneuploidias podem estar associadas ao mosaicismo, ou seja, quando um indivíduo apresenta dois ou mais tipos de linhagens celulares, apresentando células com diferentes complementos cromossômicos. Esta anomalia pode apresentar-se nas células da linha germinativa e/ou nas de linhagem somática. Quando esta anomalia provocada pelo mosaicismo afeta a linha germinativa, é bastante provável que a geração seguinte seja afetada pelo facto de existirem células reprodutivas anómalas, no entanto se o indivíduo portador de mosaicismo tiver apenas as suas células somáticas afetadas não irá transmitir esta linhagem aos seus descendentes, e neste último caso, o grau de gravidade da anomalia depende da quantidade de células anómalas presentes no indivíduo e da sua distribuição pelos diferentes tecidos. (Munné *et al.*, 1994) (Queremel Milani and Chauhan, 2020) (Youssofian and Pyeritz, 2002)

O mosaicismo poderá ter origem durante as sucessivas divisões mitóticas que levam á formação do blastocisto, em que durante essas divisões existe uma falha, havendo formação de células com cromossomas a mais ou a menos. Poderá também

ter origem num embrião inicialmente com três cópias de um cromossoma em que posteriormente houve um *cell rescue*, que levou à perda de uma das cópias, chamado de *trisomy rescue*. Um *cell rescue* é descrito como um fenómeno em que um embrião apresenta células com 3 cópias de um cromossoma e a determinado momento uma dessas cópias é eliminada, passando a haver formação de células com complemento cromossómico normal, contudo, quando os cromossomas que sobram são provenientes do mesmo progenitor, podem dar origem a zigotos com dissomia uniparental. (Conlin *et al.*, 2010) (Balbeur *et al.*, 2016) (Van Opstal *et al.*, 2018) (Caldwell *et al.*, 2020)

Existem três formas possíveis de mosaicismos na fase embrionária (Fig. 5): O generalizado, onde tanto a placenta como o embrião apresentam células normais e células alteradas; Mosaicismo confinado à placenta, onde existem apenas células alteradas na placenta, sendo o embrião normal; E o mosaicismo fetal, onde a placenta apresenta apenas células normais, mas o embrião apresenta células alteradas. (Toutain *et al.*, 2018) (Grati, 2016)

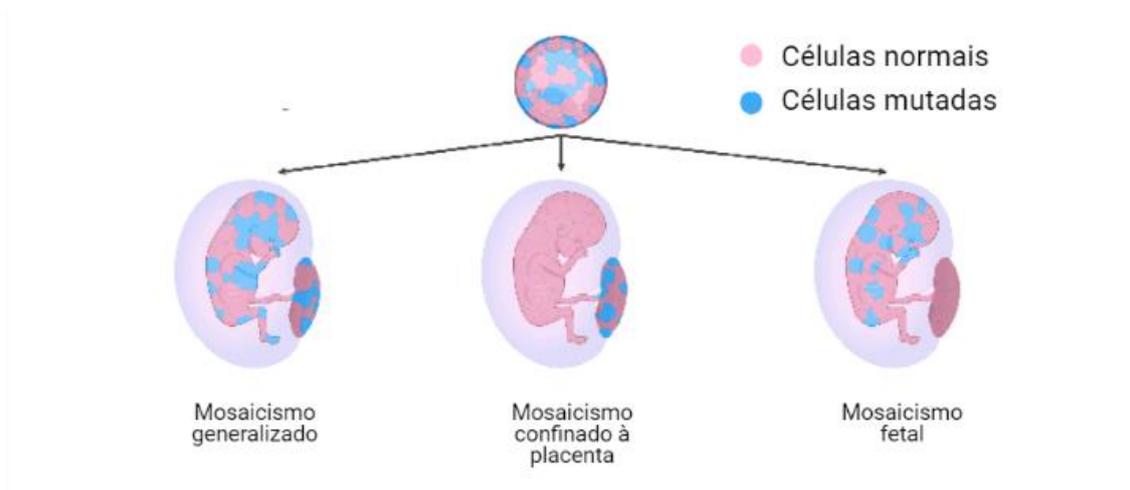


Figura 5 - Representação dos vários tipos de mosaicismo durante a gestação. Este tipo de condição pode estar ligado apenas à placenta, apenas ao embrião ou de forma generalizada.

(Fonte: <https://www.reproduccionasistida.org/wp-content//mosaicismo-confinado-a-la-placenta.png>)

### 1.3 Next generation sequencing

Em 1997, Dennis Lo, e a sua equipa descobriram a existência de cfDNA em circulação no sangue materno, abrindo portas para a criação de metodologias fiáveis de diagnóstico pré-natal não invasivo para que estas pudessem ser usadas na deteção de aneuploidias. (Norwitz and Levy, 2013) (Sahota, 2015)

A técnica NIPT, do inglês *Noninvasive Prenatal Testing*, apesar de apresentar melhores resultados que os testes de rastreio já existentes, não é considerada um teste

de diagnóstico, e por isso sempre que é obtido um resultado positivo para a presença de alguma das aneuploidias em estudo, é imperativo a sua confirmação através de um teste de diagnóstico invasivo, como a amniocentese ou a biópsia das vilosidades coriônicas.

A implementação desta técnica veio reduzir o uso de testes de caráter invasivo que podem causar algum desconforto, quer ao médico como ao casal, pois apresentam risco de aborto (ainda que bastante reduzido, > 1%). (Cheng *et al.*, 2018) (Akolekar *et al.*, 2015)

Em muitos países, as técnicas usadas para detecção de aneuploidias passam pelo rastreio bioquímico e pela ultrassonografia, no entanto apresentam uma margem de erro entre os 2 e os 7%. O teste NIPT acabou por marcar uma posição intermediária entre os testes de rastreio bioquímico e os testes invasivos, sendo oferecido a gestantes cujo risco fetal de aneuploidia é moderado. (Allyse *et al.*, 2015a)

Esta técnica tem por base o cfDNA em circulação no sangue materno. Estes fragmentos de DNA podem ser um meio de diagnóstico numa fase bastante precoce da gestação (5-7 semanas), no entanto os resultados mostram-se mais fidedignos após as 10 semanas de gestação, pelo facto de existir um aumento proporcional destes fragmentos em relação ao tempo de gestação, podendo haver uma percentagem em circulação entre 3 a 10%. Além disso, estes fragmentos desaparecem rapidamente após o parto, o que significa que não haverá possibilidade de permanecerem fragmentos de uma outra gravidez ainda em circulação, não sendo um possível fator de erro no uso da técnica. (Smet, Scott and McLennan, 2020)

Apesar de ser um teste de rastreio, não é um teste de rotina, havendo alguns critérios de inclusão e de exclusão, que podem ser redefinidos pelo laboratório em conjunto com as maternidades para que este teste possa ser oferecido, tais como: Suspeita de anomalias através de outros testes como ecografia; Historial familiar; Gravidez anterior com aneuploidias; Progenitor portador de uma translocação Robertsoniana que possa causar risco de trissomia 13 ou 21; Progenitor portador de Síndrome de Turner; Existência de risco moderado para trissomia. (Pinto Júnior, 2002) (Allyse *et al.*, 2015b)

A técnica NIPT, baseada em *next generation sequencing* (NGS) pode ser executada usando vários tipos de tecnologias, sendo as mais comuns: os métodos de contagem ou, a baseada em genotipagem através de *single nucleotide polymorphism* (SNPs).

A técnica NIPT baseada em métodos de contagem consiste na sequenciação de todo o cfDNA extraído (materno e fetal). As sequências são alinhadas com um genoma de referência para que seja feita uma correlação quantitativa entre as sequências e o cromossoma a que corresponde. Cada cromossoma assume determinada percentagem no genoma, sendo que o número final de sequências determinadas para cada cromossoma é comparado com um valor referência. A percentagem de cfDNA acima do valor referência é assumida como sendo pertencente ao feto, que ao ser comparada entre si, permite saber se algum dos cromossomas se encontra em excesso ou em minoria. (Renga, 2018) (Alberry *et al.*, 2021)

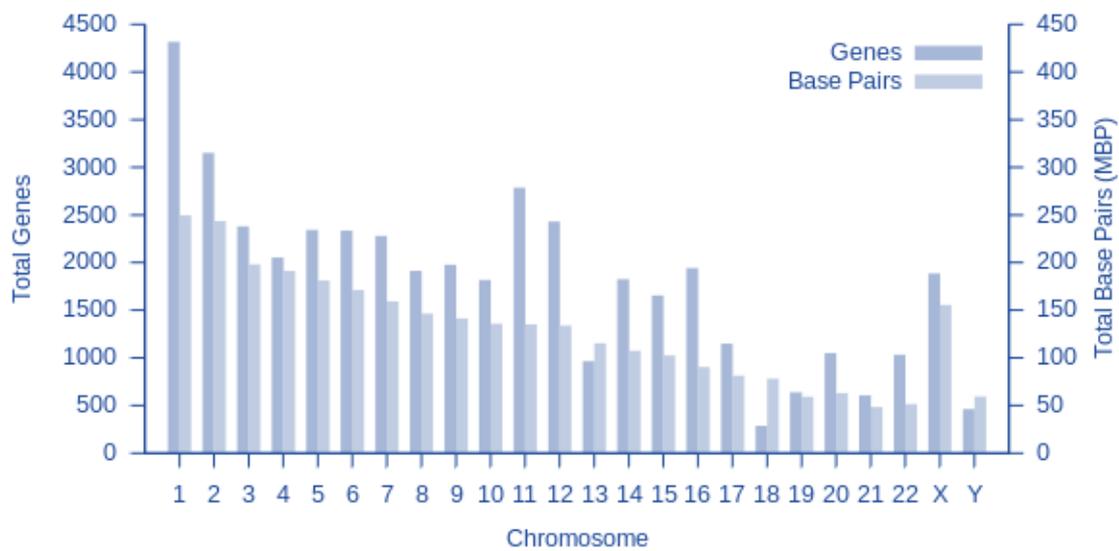


Figura 6 - Distribuição do número total de genes por cada cromossoma

(Fonte: <https://www.stressmarq.com/june-26-2000-dna-sequence-released-by-human-genome-project/?v=3e8d115eb4b3>)

A técnica NIPT alternativa, baseia-se em SNPs (genotipagem). Os SNPs são considerados uma das maiores variações genéticas que se podem encontrar no genoma humano. Estes podem aparecer tanto nas zonas codificantes como nas zonas não codificantes do genoma (exões e intrões, respetivamente), e consistem em mutações pontuais de um único nucleótido, no entanto, ao contrário das mutações, estes podem ser encontrados em mais de 1% da população normal, sendo denominados de polimorfismos. Devido a sua grande abundância no genoma humano, estas variações genéticas podem ser usadas como marcadores genéticos (Deng *et al.*, 2017) (Butler, 2012) (Brody, 2016) (Jin *et al.*, 2016)

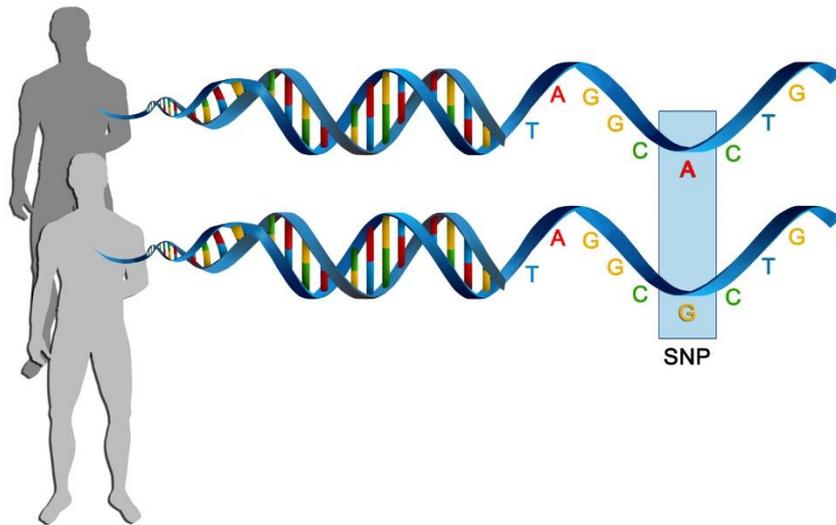


Figura 7 - Imagem representativa da presença de um SNP numa sequência de DNA

(Fonte: <https://www.genengnews.com/topics/omics/study-finds-genetic-basis-of-common-diseases-may-span-tens-of-thousands-of-snps/>)

Grande parte dos SNPs não conferem nenhum grau de suscetibilidade ao indivíduo portador pois encontram-se em zonas do genoma que não apresentam uma função crítica. No entanto, existem SNPs que poderão aumentar a predisposição do indivíduo a determinadas doenças como a diabetes ou problemas cardiovasculares. Por este motivo, é também bastante importante o estudo aprofundado de SNPs, de modo a perceber quais, e de que forma acabam por determinar a predisposição de um indivíduo a desenvolver determinadas doenças. (*Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*, 2014) (*single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable*, 2014)

No método de NIPT baseado em genotipagem por SNPs, é usado um painel multiplex de primers específicos para zonas de interesse específicas. No nosso caso, ao longo dos cromossomas 13, 18, 21 e sexuais. Após a amplificação, são gerados amplicões contendo estas zonas polimórficas e as amostras são sequenciadas. Em termos genéticos, o feto irá herdar, material genético da mãe, mas também do pai e, após sequenciação do cfDNA, alguns dos SNPs identificados serão diferentes dos de origem materna. Esses SNPs, herdados do lado paterno, são assumidos num algoritmo de análise, como pertencentes ao feto, possibilitando distinguir o material genético materno do fetal, calcular a fração fetal e determinar o risco de presença de aneuploidias. (Yamamoto *et al.*, 2020)

Este método apresenta uma elevada sensibilidade (verdadeiros positivos) e especificidade (verdadeiros negativos), apresentando taxas de 99% de sensibilidade

para a Síndrome de Down, sendo ligeiramente mais baixa na deteção das aneuploidias ligadas aos cromossomas 13 e do 18, apresentando uma taxa de falsos positivos de cerca de 1-3%. (Allyse *et al.*, 2015a)

Embora a taxa de aborto provocada pelas técnicas invasivas quando feitas por clínicos experientes sejam inferiores a 1%, essa é uma das grandes causas que leva o casal a recusar este tipo de técnicas, sendo por isso uma mais valia o uso do NIPT, permitindo reduzir o uso de técnicas de carácter invasivo.

Este tipo de teste pode ainda ser usado para determinar o sexo do feto mais cedo que os métodos convencionais, no entanto, esta não é uma das prioridades do uso deste teste. Em alguns locais da Europa é também usado para detetar o RhD do feto, impedindo assim que senhoras RhD negativo sejam sujeitas a tratamentos profiláticos. (Smet, Scott and McLennan, 2020)

Este teste é comercializado por várias companhias em todo o mundo, entre as quais temos a Illumina (USA), offers verifi™; The Harmony™ Prenatal Test by Ariosa Diagnostics (USA), Natera (USA), LabCorp, Iviomics e a LifeCodexx. Todas as empresas referidas anteriormente oferecem testes para detetar aneuploidias nos cromossomas 13, 18 e 21, no entanto, a deteção de aneuploidias ligadas aos cromossomas sexuais e a determinação do sexo fetal não é oferecida por todas, variando consoante a companhia e o país onde se encontra, pois, uma aneuploidia ligada ao sexo não é considerada incompatível com a vida e a determinação do sexo fetal numa fase tão precoce pode despoletar problemas éticos. (Smet, Scott and McLennan, 2020)

A implementação deste teste, inicialmente, suscitou algumas dúvidas sobre a posição que este teria relativamente aos restantes testes já usados, tendo sido mesmo equacionado que este pudesse substituir o rastreio bioquímico, que fosse um teste intermédio entre os testes não invasivos e invasivos, ou que viesse a substituir alguns testes invasivos atualmente usados. Têm sido reportados estudos que revelaram que os resultados obtidos através de NIPT foram discordantes com os resultados obtidos através de técnicas invasivas. Existem vários fatores que originaram estes resultados divergentes: mosaicismo confinado a placenta, gestação gemelar, fração fetal baixa, mosaicismo e causas oncológicas. Além disso, a deteção de microduplicações e microdeleções através da técnica NIPT é limitada, tendo sido relatado casos em que só são detetadas se apresentarem um tamanho superior a 300kb. Não deteta rearranjos equilibrados nem aneuploidias parciais. Tendo em conta estes argumentos, o teste NIPT

foi declarado um teste de segundo nível, entre testes invasivos e não invasivos, para utilização, em gestações de risco moderado. (Yin *et al.*, 2019) (Allyse *et al.*, 2015b)

### 1.4 Viabilidade económica

Um estudo feito em 2015, sobre a incorporação do NIPT a nível global revelou que este teste pode custar entre os 295€ e os 2445€, variando de país para país (Fig. 8). Durante o estudo foram questionados 78 indivíduos de diferentes países, dos quais apenas 49 completaram o questionário. Todos revelaram existir acesso a esse teste no seu país. No entanto, quando questionados de quem teria oportunidade de beneficiar deste teste, as respostas diferiram, desde “a todas as mulheres independentemente da idade”, “mulheres com alto risco de aneuploidias”, “mulheres que solicitam” e “mulheres que podem pagar pelo teste”. (Minear *et al.*, 2015)

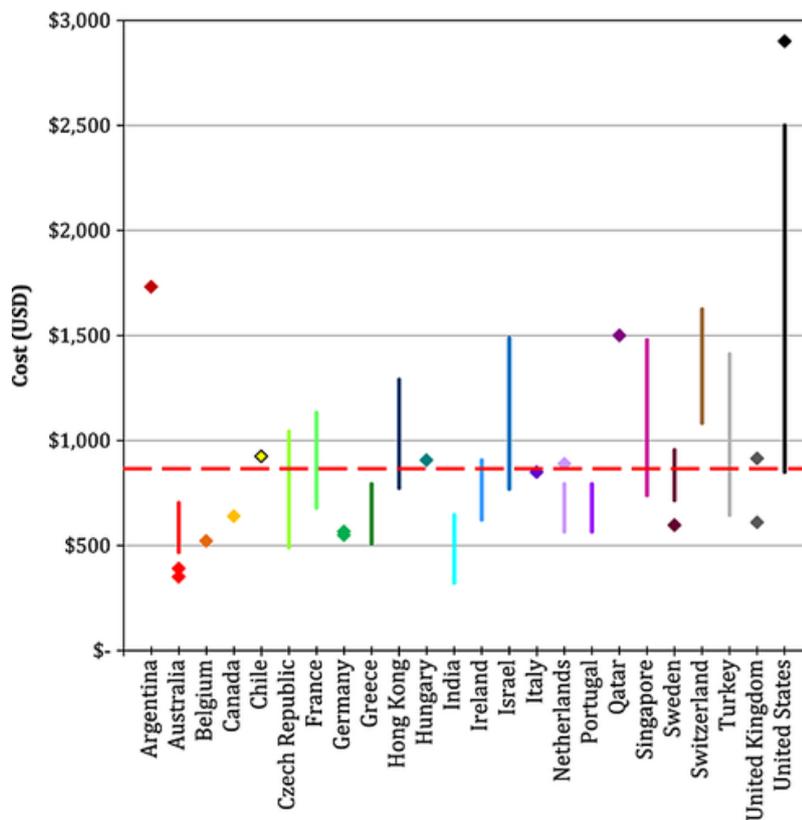


Figura 8 - Margem de valores praticados pela realização do teste NIPT em diferentes países do mundo, incluindo Portugal.

(Fonte: “Global perspectives on clinical adoption of NIPT” (<https://doi.org/10.1002/pd.4637>), consultado em março de 2021)

Um outro estudo feito em Espanha, em 2019, mostra que os custos da aplicação deste teste dependem da estratégia adotada. Para tal, foram definidas três estratégias: exame de primeiro e segundo trimestre (exames recorrentemente usados sem NIPT), teste de contingência (NIPT usado quando o risco é superior a um cut-off 1:270 e uma translucência nucal (TN) superior a 3.5mm) e teste de primeira linha (usado sempre em conjunto com outros testes de primeira linha), e foram comparados o custo/benefício de cada uma. (Bayón *et al.*, 2019)

Foi concluído que quando usado como teste de contingência (cut-off 1:270), com um custo associado de 550€ por teste, mostrou haver uma redução nos casos detetados com Síndrome de Down em relação aos procedimentos recorrentemente usados, havendo também uma diminuição da taxa de abortos causados por testes invasivos, devido à diminuição do uso destes. Usando a mesma estratégia, mas diminuindo o cut off de 1:500 e 1:1000 foi ainda possível observar o aumento de casos de Síndrome de Down detetados, no entanto isso levaria a um aumento de cerca de 3,5% nos custos. Quando usado como teste de primeira linha verifica-se que de facto torna-se um teste bastante mais efetivo, no entanto muito mais dispendioso para a entidade que assume os custos em cada país, quando comparado com a estratégia anterior ou com os testes recorrentemente usados. (Bayón *et al.*, 2019)

Um outro estudo, realizado em 2017, onde foi efetuada uma revisão de doze outros artigos sobre o tema, mostrou que não existe uma concordância absoluta em relação ao NIPT usado como método de contingência. Nove destes dozes estudos fizeram uma avaliação entre o NIPT e os métodos comumente usados como a ultrassonografia, o rastreio integrado e o rastreio combinado, na qual a resposta foi unânime, o NIPT é certamente mais eficaz, no entanto, sete destes também referiram que apesar de eficaz, também se mostrava mais dispendioso para a entidade que o oferece (que em Portugal é o Sistema Nacional de Saúde). E, mais uma vez, é frisado que o uso de NIPT, como teste de primeira linha, é certamente mais eficaz, mas bastante mais dispendioso. (García-Pérez *et al.*, 2018)

Em suma, o custo da implementação deste tipo de testes depende da estratégia adotada por cada país, no entanto, seja qual for a estratégia será sempre mais dispendiosa para a entidade ou indivíduo que tenha que assumir os custos, em relação aos métodos normalmente utilizados, como o rastreio integrado ou até os métodos invasivos como a amniocentese. Contudo, alguns autores defendem que esse custo adicional pode ser visto como um “custo-benefício” pelo facto de diminuir os custos

associados ao uso de testes invasivos e ao nascimento de crianças portadoras de trissomia 13,18 e 21. (García-Pérez *et al.*, 2018) (Bayón *et al.*, 2019)

## 1.5 Impacto populacional

A principal causa do aparecimento de aneuploidias está relacionada com a idade materna avançada. A mulher à nascença já contém um número definido de folículos, ao contrário dos homens que vão produzindo gâmetas ao longo da vida. Isto implica que a idade de uma mulher seja correspondente à idade dos seus oócitos, potencializando algumas anomalias. Estima-se que a idade mais fértil de uma mulher é entre os 20 e os 30 anos, começando a decair abruptamente até que se atinja a menopausa (Fig.9). Desta forma, considera-se uma mulher de 35 anos já reprodutivamente envelhecida. (Silva *et al.*, 2015)

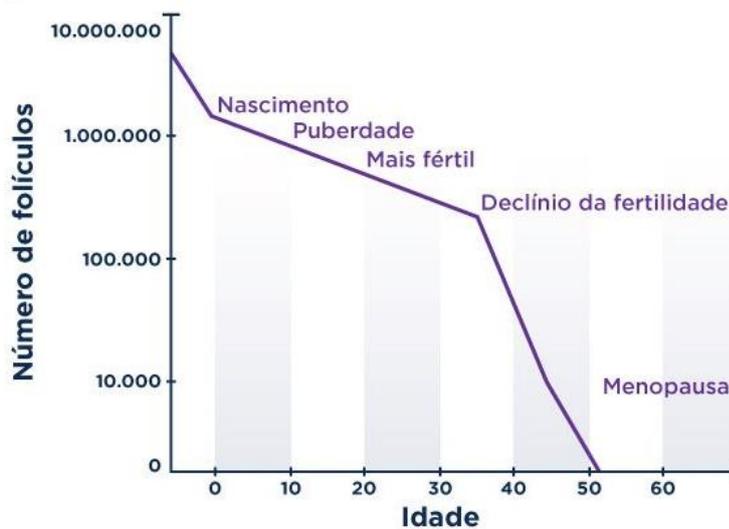


Figura 9 – Evolução da fertilidade de uma mulher ao longo dos anos, na qual se pode verificar um decréscimo acentuado da mesma após os 35 anos.

(Fonte: <https://br.clearblue.com/como-engravidar/quantos-ovulos-eu-tenho>)

Além disso, segundo o Instituto Nacional de Estatística Português, nota-se uma redução da percentagem de mulheres em idade fértil residentes em Portugal do ano de 2013 para o ano de 2019. (Portal do INE, 2021)

Contudo, devido a diversos fatores, tanto económicos como sociais, é notório que não só os jovens já não pretendem ter tantos filhos, como a idade em que pensam iniciar a sua vida parental é cada vez mais tardia. Um inquérito realizado em 2019 pelo Instituto Nacional de Estatística em Portugal em torno da temática da fecundidade,

mostrou que cerca de 93% das mulheres com idades compreendidas entre os 18 e os 29 anos ainda não tinham filhos. (*Portal do INE, 2021*)

Estudos indicam que tanto homens como mulheres têm uma opinião positiva em relação ao teste NIPT, não só porque não apresenta risco de aborto, mas também porque diminui a probabilidade de se ter que prosseguir com outros testes, aumentando o tempo de espera e a ansiedade junto dos progenitores. Além disso, um outro ponto positivo visto por parte dos progenitores, é o facto deste teste poder ser executado numa fase prematura da gravidez, evitando interrupção médica da gravidez numa fase mais tardia, no qual o nível de desenvolvimento fetal é mais avançado, em que os progenitores se sentiriam mais ligados a nível emocional. (*van Schendel et al., 2014*)

Este tipo de testes permite detetar a presença das aneuploidias mais comuns como já foi referido anteriormente, no entanto é considerado apenas um teste de rastreio e não de diagnóstico, sendo necessário a aplicação de métodos invasivos para confirmação de um resultado positivo.

Por este motivo, durante a gravidez, todos os testes de DPN, quer invasivos ou não invasivos, devem ser sempre acompanhados por consultas de aconselhamento genético, para que os progenitores possam esclarecer as suas dúvidas e serem informados acerca de todas as implicações que podem advir dos diferentes tipos de testes. Por outro lado, é ainda importante que os progenitores saibam que após um resultado positivo num diagnóstico não invasivo, é necessária a sua confirmação através de um diagnóstico invasivo e que lhes é oferecida uma interrupção médica da gravidez, que de acordo com a lei portuguesa, poderá ser realizada até às 24 semanas de gestação. (*Aite et al., 2006*) (*Decreto-Lei n.º 48/95, consultado a 6 de junho 2021*) (*Saraiva, 2013*)

Benachi *et. al* elaborou um estudo entre 2016 e 2017, no qual foram analisadas as respostas obtidas a um questionário de 75 perguntas sobre a prática clínica do teste NIPT e o aconselhamento sobre o mesmo. No total foram obtidas 634 respostas: 263 por obstetras e ginecologistas, 197 por especialistas em medicina materno-fetal, e as restantes por enfermeiras. Em relação ao aconselhamento, quer antes, quer após o teste NIPT, todos os profissionais questionados concordaram que este é fundamental na prática do teste NIPT, sendo importante discutir a probabilidade de o resultado não ser 100% correto devido à possibilidade de ocorrência de falsos negativos, falsos positivos ou até inconclusivos (Fig.10). (*Benachi et al., 2020*)

É ainda importante mencionar que através desta técnica podem ser identificadas ocasionalmente alterações genéticas incidentais nos progenitores, sendo importante um

aconselhamento cuidado. (“Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy,” 2015)

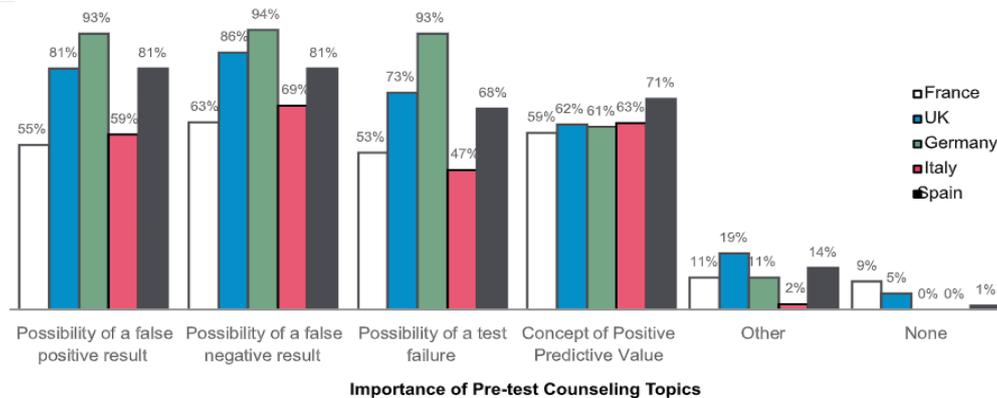


Figura 10 - Tópicos a serem tratados durante as consultas de aconselhamento e a importância dada por cada país

(Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.01.006>)

## 1.6 Vantagens e desvantagens

A técnica NIPT, além de ser um método não invasivo, e por isso se mostrar mais segura quando comparada com métodos invasivos, apresenta um grande leque de vantagens, quer para o feto como para os progenitores.

No geral, os métodos não invasivos não apresentam risco de perda fetal e podem ser realizados mais precocemente que os invasivos, permitindo que sejam tomadas medidas mais cedo. No entanto estes são apenas métodos de rastreio, sendo necessário confirmar um resultado positivo com um método invasivo. (Gregg *et al.*, 2016)

O uso de DNA fetal em circulação sanguínea no sangue materno, como meio de rastreio para aneuploidias mais comuns, nem sempre permite um resultado conclusivo, podendo ainda existir falsos positivos e falsos negativos. Apresenta ainda um custo elevado comparativamente com outros métodos, muitas vezes o cfDNA em estudo é escasso, principalmente quando as mães são obesas, originando uma baixa fração fetal.

Apesar de ser uma técnica rigorosa e de elevada eficácia, existem situações que não permitem o uso desta técnica: gestações múltiplas, idade gestacional inferior a 10 semanas, gestantes obesas e ainda neoplasia materna. (Miragaia *et al.*, 2020)

Quando existe uma gravidez múltipla e um dos embriões acaba por envolver numa fase precoce (gémeo absorvido) poderá originar falsos positivos, derivados de uma

elevada fração fetal e presença de outra fonte de DNA diferente da do feto presente. (Smet et al., 2020)

Os resultados podem ainda ser afetados em casos de mosaicismo confinado à placenta afetados pela presença de células anormais, detetadas durante o teste NIPT, dando origem a um falso resultado positivo para aneuploidia, com origem na placenta e não no feto. (Smet et al., 2020)(Cui *et al.*, 2019)

Uma outra limitação, mais rara, quando a gestante recebeu anteriormente um transplante de órgãos, originando a produção de cfDNA (derivado desse órgão), constituindo uma terceira fonte de genoma em circulação sanguínea. Pelo mesmo motivo, este teste também não é aplicável quando se trata de dadoras de óvulos. (Smet et al.,2020)

Contudo, quando bem-sucedido reduz em cerca de 98% o uso de técnicas invasivas.

É exequível ainda detetar doenças de manifestação tardia ou que evoluem de forma silenciosa, principalmente nos progenitores, para que estes possam então ter o tratamento adequado e atempado, impedindo que a doença evolua para algo mais grave.

## 2. Objetivos

- Familiarização e aplicação da Metodologia de NGS na preparação de bibliotecas a partir de cfDNA;
- Aplicação do teste NIPT numa amostragem selecionada de grávidas com risco de aneuploidias mais comuns: 13, 18, 21, X e Y seguindo critérios de inclusão definidos;
- Análise e Interpretação dos resultados obtidos;
- Correlação dos resultados obtidos com determinados parâmetros tais como: Índice de Massa Corporal (IMC), Fração Fetal (FF), quantidade/qualidade do cfDNA e qualidade da amostra;
- Emissão de um relatório.

## 3. Metodologia

Toda a metodologia deste procedimento foi baseada nos protocolos implementados no Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A metodologia aplicada pode ser dividida em 5 passos: Recolha de amostras, Isolamento do plasma e Extração do cfDNA, Preparação da biblioteca, Sequenciação e Análise de dados.

### 3.1. Recolha da amostra

Este procedimento tem por base a sequenciação de cfDNA de origem fetal em circulação no sangue materno, constituindo o primeiro passo do processo, a recolha de uma amostra de sangue em tubos específicos, contendo EDTA (ácido etilenodiamina tetra-acético) e estabilizador específico de cfDNA.

Esta etapa, realizada externamente nas instituições requerentes, é crítica, uma vez que se não for feita de forma adequada, poderá condicionar de forma negativa os resultados.

### 3.2. Isolamento e congelamento do plasma

A amostra é enviada para o laboratório à temperatura ambiente, sendo imperativo que não ultrapasse mais de 24h para ser processada, após a colheita.

O processamento é feito através de uma centrifugação de 10min a 1600g s, que permite a separação dos constituintes celulares em fase. Por pipetagem, é recolhido o sobrenadante, correspondente ao plasma, onde se encontra o cfDNA (materno e fetal). Para obtenção de um material mais puro este é novamente centrifugado durante 20min a 2300g e recolhido para um outro tubo.

Após o isolamento do plasma, este é congelado a uma temperatura mínima de -20°C até que se obtenha o número de amostras estabelecido para cada lote de análise.

### 3.3 Extração do cell free DNA

Obtidas as amostras, procede-se ao descongelamento lento *overnight* a uma temperatura ambiente, em gelo, seguido da extração do cfDNA presente no plasma.

No processo de extração, as etapas de centrifugação são substituídas por um sistema de vácuo, para evitar que os fragmentos de cfDNA sejam danificados pois estes são bastante frágeis. Durante este processo, para isolamento do plasma, são utilizados tubos de coluna de sílica à qual o cfDNA se vai ligar.



Figura 11 - Método de extração por vácuo

(Fonte: LCG-FMUC, 2020)

Ainda durante a extração, procede-se à purificação do material através de sucessivas lavagens com soluções de composição majoritariamente com álcool, de modo a remover proteínas e outros resíduos que ainda se encontrem na coluna.

Após a purificação do cfDNA, é necessário libertar os ácidos nucleicos da coluna de sílica. Para isso é usada água ou tampão de eluição (TE), sendo este último preferível uma vez que possibilita a conservação da amostra por períodos mais longos.

### **3.4 Controlo de qualidade do cfDNA extraído**

Após a extração é necessário fazer um controlo da qualidade das amostras, de modo a verificar se todos os passos da extração de cfDNA foram bem-sucedidos e determinar se cada amostra apresenta quantidade e qualidade suficiente para poder ser processada. Dadas as características do cfDNA, (fragmentos pequenos e em pequena quantidade), é necessário recorrer a um fluorímetro (aparelho que mede a concentração através de fluorescência), de modo a determinar as concentrações de cada amostra, cujos valores mínimos e máximos deverão estar entre 0,10ng/μl e 0,80ng/μl, valores estes que são obtidos através de um fluorímetro e que foram calculados de acordo com um protocolo validado e otimizado CE-IVD.

Se inferiores a 0,10ng/μl, será necessário realizar uma nova colheita de sangue e uma nova extração, pois o valor é demasiado baixo para que seja possível a construção de uma biblioteca viável. Se superiores a 0,80ng/μl, o processamento da amostra prossegue, no entanto com a possibilidade de contaminação do cfDNA com DNA genómico materno, que poderá afetar negativamente os resultados devido a uma redução da FF.

## **3.5 Preparação das bibliotecas**

### *3.5.1 PCR multiplex*

Nesta etapa é realizada uma amplificação de regiões alvo específicas para os cromossomas 13, 18, 21 e sexuais, com recurso à técnica *de reação de polimerização em cadeia* (PCR). Para isso, é usado um painel comercial de *primers* específicos da illumina que vão permitir gerar amplicões contendo as zonas alvos com SNPs, nos cromossomas em estudo, 13, 18 e 21. Além da amplificação das regiões de interesse, esta reação de PCR, com uma duração de 2h, serve ainda para inserir *tags* específicas

nas extremidades dos amplicões específicos para a plataforma de NGS a utilizar. (Bisco, 2017)

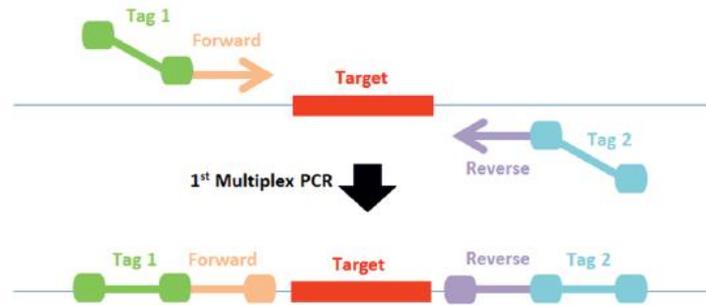


Figura 12 - Adição de tags através de primers específicos aos fragmentos de interesse

(Fonte: <https://www.eligene.com/eligene-kits-for-next-generation-sequencing.html>)

### 3.5.2 PCR universal

Após a construção da biblioteca, procede-se a um segundo PCR, denominado de universal com uma duração de aproximadamente 2h, onde vão ser inseridos identificadores moleculares, também conhecidos como *barcodes*, denominados de p5 e p7 no caso da *Illumina*. Estes *barcodes* de seqüências específicas, permitem distinguir os amplicões de cada gestante antes da sequenciação. Esta etapa é necessária para permitir a sequenciação simultânea de várias amostras (10 a 12 amostras no nosso caso) reunidas num único *pool*, otimizando a corrida de sequenciação e permitindo posteriormente a análise individualizada de cada amostra. (Bisco, 2017)

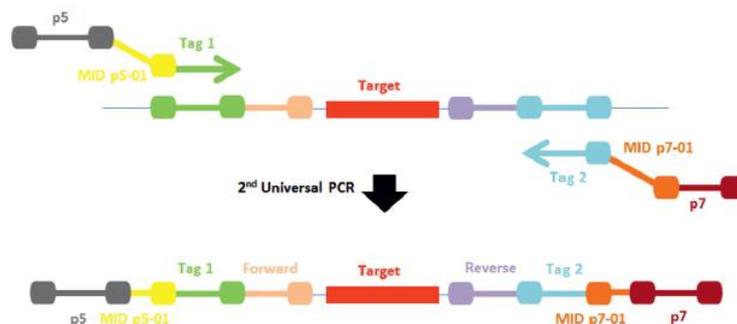


Figura 13 - Adição de barcodes nas extremidades dos fragmentos de interesse

(Fonte: <https://www.eligene.com/eligene-kits-for-next-generation-sequencing.html>)

### 3.5.3 Controlo de Qualidade da Biblioteca

Após o PCR Universal, é feito um segundo ponto de controlo com o objetivo de determinar o sucesso das reações de PCR. Este controlo de qualidade é feito através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem de 10v com duração de 1h, (Fig 14) para verificar se o tamanho dos amplicões corresponde com o previsto para o protocolo utilizado, que no nosso caso é 216pb.

Todas as amostras que não cumpram com os pesos moleculares previstos, não prosseguem na análise.

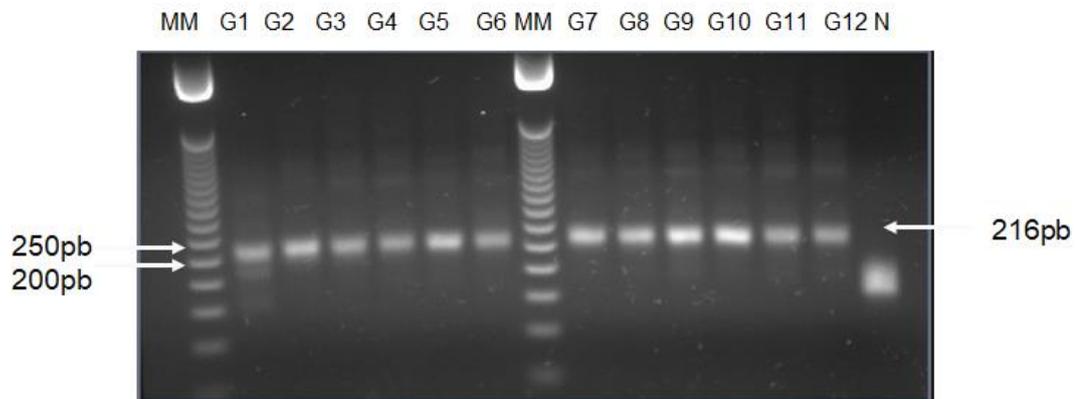


Figura 14 - Corrida de eletroforese em gel de agarose

Fonte: LCG-FMUC, 2021

### 3.5.4 Purificação

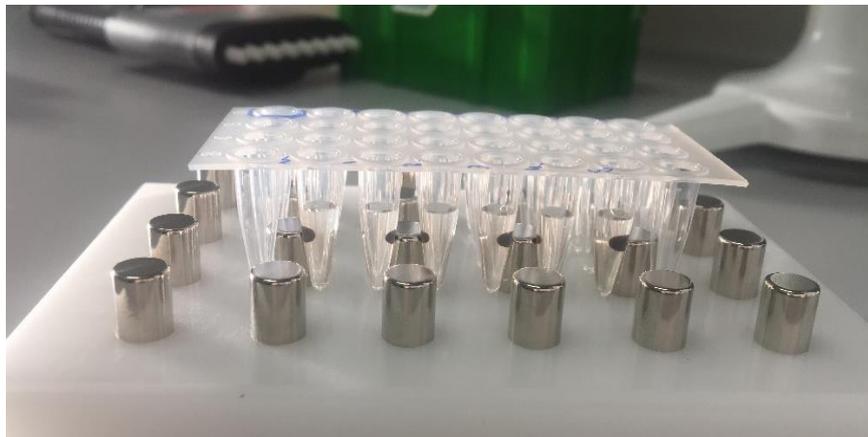
As bibliotecas validadas no ponto de controlo anterior prosseguem para um processo de purificação através de *beads* magnéticas. Estas “pequenas esferas” têm a capacidade de capturar o DNA de forma seletiva (tamanho), isolando os fragmentos de interesse dos inespecíficos (posteriormente descartados). Desta forma é possível isolar os fragmentos de interesse do resto de material que possa ainda estar na amostra, como produtos de PCR e pequenos fragmentos residuais de DNA. O procedimento inicia-se com a adição de 30µl água e de 55µl *beads* a cada 20µl de produto de PCR Universal por poço, numa placa de 96 poços seguido de homogeneização por pipetagem. Após 5 minutos, a placa é colocada num magneto, que tem como função separar as *beads* da fase aquosa devido a sua capacidade de atração magnética, funcionando como um separador magnético. A fase aquosa é posteriormente descartada junto com outros resíduos que ainda possam existir na

amostra. Em seguida são adicionados 200µl de álcool a 70% em cada poço para lavagem de eventuais elementos inespecíficos nas *beads*. Após esta purificação adiciona-se 20µl de água à placa, retira-se do separador magnético e homogeneiza-se vigorosamente por pipetagem de modo a transferir as bibliotecas purificadas para a solução líquida ao seu redor. Volta-se a colocar a placa no separador magnético, separando as *beads* do DNA que fica em solução no líquido. A fase líquida, contendo o DNA a sequenciar, é transferida para uma nova placa para posterior sequenciação.



*Figura 15 - Processo de purificação através de beads magnéticas*

(Fonte: LCG-FMUC, 2020)



*Figura 16 - Processo de purificação através do uso de beads magnéticas*

(Fonte: LCG-FMUC, 2020)

### 3.5.5 Pooling

Na plataforma de NGS utilizada, MiSeq (Illumina), a sequenciação ocorre numa *flowcell* monocanal (células de fluxo que contêm nanoporos onde ocorre a formação de clusters), exigindo por isso, quando se pretende correr várias amostras em simultâneo, a mistura equimolar das amostras a sequenciar, num único pool. É por isso muito importante determinar as concentrações finais de cada amostra, o número máximo de amostras a correr, e ajustar as concentrações de cada uma de modo a garantir a equimolaridade e, que a *flowcell* não fique nem sobrecarregada, nem subaproveitada. No protocolo otimizado, o número ideal de amostras a correr é de 10 a 12. Abaixo disso, seria economicamente dispendioso. Para isso recorre-se a um fluorímetro, medem-se as concentrações de cada biblioteca em duas medições independentes, utilizando a concentração média para determinar os volumes a adicionar de cada amostra de forma a manter a equimolaridade. (*Tecnologia de célula de fluxo padronizada*, 2021)

Para facilitar o cálculo dos volumes recorre-se a uma tabela Excel (como a representada na tabela II), onde são inseridas as concentrações obtidas no fluorímetro e são calculados automaticamente os volumes a adicionar de cada amostra.

Tabela II -- Representação da tabela excel usada para cálculo dos volumes a adicionar de cada amostra

	Sample ID	C° 1 (ng/μL)	C° 2 (ng/μL)	C° 3 (ng/μL) (Optional)	Average	Volume per library	ng per library
S1	Ni392	16,1	15,7		15,9	5,89	93,6
S2	Ni393	15,6	15,6		15,6	6,00	93,6
S3	Ni394	19	17,5		18,3	5,13	93,6
S4	Ni395	17,4	16,3		16,9	5,55	93,6
S5	Ni396	17,5	17,2		17,4	5,39	93,6
S6	Ni397	20,1	19,6		19,9	4,72	93,6
S7	Ni398	17,6	15,3		16,5	5,69	93,6
S8	Ni399	17,8	17,4		17,6	5,32	93,6
S9	Ni400	16,1	15,5		15,8	5,92	93,6
S10	Ni401	16,6	15,6		16,1	5,81	93,6
S11	Ni402	17,5	17		17,3	5,43	93,6
S12	Ni403	16,2	15,7		16,0	5,87	93,6
...	Insert rows above				-	-	-

## 3.6 Sequenciação

Após a preparação do *pool* final (que necessita de ser diluído a 5,3pM de modo a alcançar a densidade ideal, para que a *flowcell* não fique sobrecarregada), este vai ser corrido na plataforma *MiSeq* (*Illumina*) num regime *single read* de 76 ciclos, com uma duração de 10h.

Esta plataforma é constituída por um compartimento direcionado a inserção da *flowcell*, um compartimento para os reagentes, um ecrã *touchscreen*, um canal USB, uma barra de *status* e um compartimento ótico.



Figura 17 - Sequenciador MiSeq da Illumina

(Fonte: <http://www.fcf.usp.br/departamentos/pagina.php?menu=75&pagina=460&departamento=2>)

Tanto os reagentes como a *flowcell* são comercializados em lotes (Fig.18) com determinado código de barras, código esse que é inserido no ficheiro criado antes do início da corrida na plataforma MiSeq. (Illumina, 2019) .

Estes kits de reagentes da Illumina são exclusivos da plataforma utilizada e incluem uma *cartridge* com vários compartimentos, (incluindo um para a adição da amostra) e uma *flowcell* para a leitura ótica.



Figura 18 - Lote de reagentes usado para sequenciação e *flowcell* onde se vão ligar as bibliotecas a serem sequenciadas.

(Fonte: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits.html>)

Durante o processo, a biblioteca é injetada numa *flowcell* e os fragmentos vão ligar-se a esta por hibridização através dos adaptadores previamente inseridos no PCR multiplex, para serem sequenciados (Fig.19).

Em fases sucessivas, são injetadas soluções de nucleótidos específicos, que ao incorporarem os amplicões emitem fluorescência. Esta fluorescência é capturada por camaras de alta sensibilidade e os restantes nucleótidos que não se ligarem são removidos, repetindo-se este processo ao longo dos ciclos (Fig.20). As imagens são registadas e guardadas digitalmente em ficheiros e o *software* é capaz de calcular a qualidade do processo de sequenciação. (Chaitankar et al., 2016).

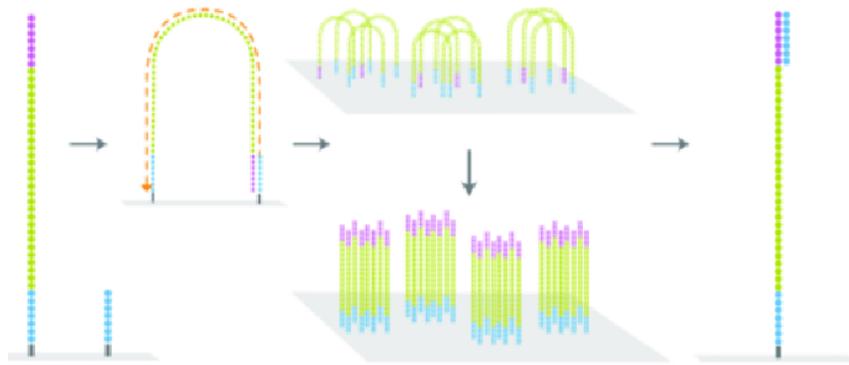


Figura 20 - Ligação dos amplicões à flowcell através dos adaptadores previamente adicionados.

Fonte: [https://www.researchgate.net/publication/325184342\\_Unraveling\\_evolution\\_through\\_Next\\_Generation\\_Sequencing/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/325184342_Unraveling_evolution_through_Next_Generation_Sequencing/figures?lo=1)

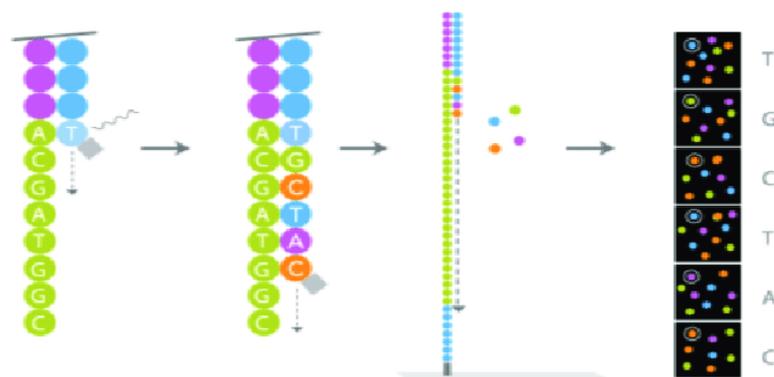


Figura 19 - Sequenciação através de síntese e emissão de fluorescência aquando a ligação dos nucleótidos. Ligação dos amplicões à flowcell através dos adaptadores previamente adicionados.

Fonte: [https://www.researchgate.net/publication/325184342\\_Unraveling\\_evolution\\_through\\_Next\\_Generation\\_Sequencing/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/325184342_Unraveling_evolution_through_Next_Generation_Sequencing/figures?lo=1)

### 3.7 Análise de dados

Após a sequenciação, os ficheiros com os resultados são convertidos em formato FASTQ, ficheiros individuais para cada gestante, onde está guardada toda a informação obtida durante a sequenciação. Estes ficheiros incluem, para além das sequências, um score para a qualidade da leitura que nos indica qual probabilidade de a base atribuída naquele local da sequência estar errada.

Esses ficheiros são importados e enviados para uma *pipeline* informática (Clarigo – Empresa Agilent) que executa toda a análise de dados. Uma pipeline está diretamente ligada com a capacidade que um processador tem de executar várias tarefas por fases, iniciando uma nova tarefa sem que tenha ainda terminado por completo a anterior, fazendo uma leitura otimizada e muito mais rápida que o normal. Durante o processamento é feita uma avaliação da qualidade da sequenciação e uma remoção das sequências pertencentes aos amplicões de modo a reduzir o ruído.

Em seguida, as sequências válidas são alinhadas com um genoma de referência e é feita a identificação de variantes (SNPs no nosso caso). Nesta etapa, o parâmetro mais importante é a quantidade de leituras que cobre determinada sequência, também conhecida como cobertura da sequência que, quanto mais elevada melhor. Após o alinhamento e a anotação das variantes, é então possível obter informação sobre a qualidade do alinhamento, qualidade do mapeamento e comparar os dois perfis de genotipagem (materno e fetal).

Os resultados são gerados em formato de um relatório, onde constam parâmetros importantes como a FF, o sexo do feto e o risco ou não de aneuploidias. O cálculo de risco de aneuploidias nos cromossomas 13,18,21 é obtido através de um cálculo estatístico do Z-score (Fig.21). O Z-score fornece evidências para a presença de trissomia fetal. Quando não existe evidência de trissomia este valor é 0 com um desvio padrão de 1, no entanto, valores superiores indicam que pode existir trissomia.



Figura 21 – Relatório de um resultado NIPT após a análise de dados

(Fonte: LCG-FMUC, 2021)

Contudo, apesar de o relatório já descrever os resultados relativos a cada gestante e a cada cromossoma em análise, estes têm que ser manualmente analisados e interpretados por um dos profissionais do laboratório. Após essa análise existe ainda a verificação por parte de um segundo profissional. Por fim é emitido um relatório com os resultados a enviar para o médico, que é assinado pelo profissional que fez a análise, pelo que fez a verificação e ainda por uma terceira pessoa, por norma a responsável do laboratório.

## 4. Resultados

A técnica do NIPT é uma técnica certificada no LCG-FMUC exigindo que só pode ser realizada por pessoas previamente certificadas. Por esse motivo, tive a oportunidade de acompanhar todos os passos da mesma, e sempre que possível, realizar algumas etapas sob supervisão tutorial. Foi-me possibilitado não só fazer a análise dos resultados de NIPT obtidos durante o ano letivo 2020/2021, mas também um apanhado retrospectivo de todos os resultados anteriores, desde que se iniciou a técnica no laboratório.

Em relação ao resultado de um teste NIPT, este pode ser classificado em: baixo risco para a presença de aneuploidias, elevado risco para uma aneuploidia específica, ou inconclusivo. Este trabalho pretende a análise dos testes NIPT realizados, obtendo-se um total de 846 testes NIPT entre os quais: 731 resultados negativos, 101 inconclusivos e 14 sugestivos de presença de aneuploidia.

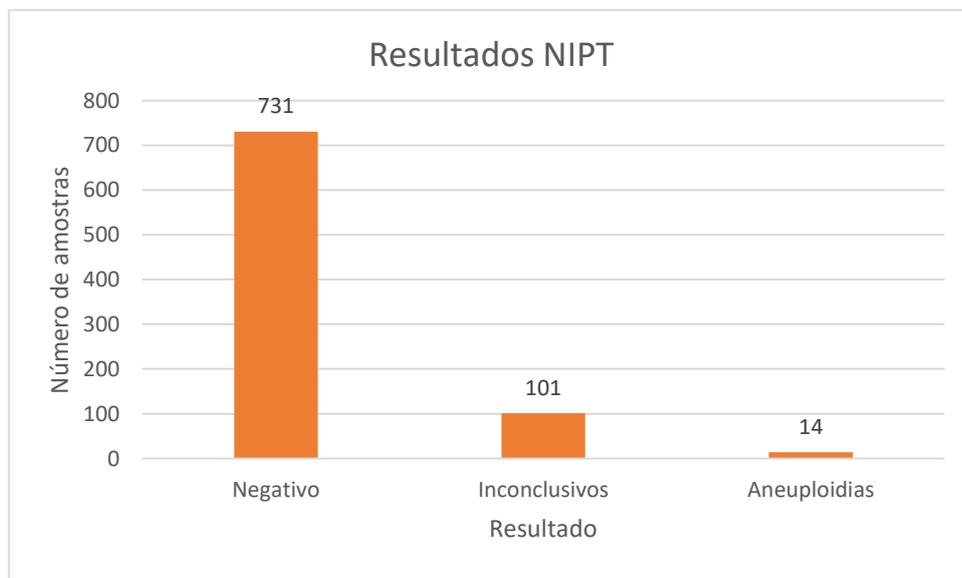


Gráfico I - Resultados NIPT

Relativamente às 14 aneuploidias detetadas por NIPT-NGS: 9 eram de fetos portadores de trissomia 21, 3 fetos portadores de trissomia 13 e 2 com forte probabilidade de serem portadores de uma aneuploidia ligada aos cromossomas sexuais. No entanto, como já foi referido anteriormente, este teste não é um teste de

diagnóstico, sendo sempre necessário a confirmação de um resultado positivo através de um teste de carácter invasivo.

Quanto aos resultados negativos, que remetem para a inexistência de risco para as aneuploidias em estudo, o valor foi de 731 casos em 846 testes, representando cerca de 86% dos casos totais. Estes valores altos já eram expectáveis tendo em conta que, quando o risco de ocorrência de aneuploidias é muito elevado, é executado um teste invasivo e não o NIPT, que deve ser oferecido em casos de risco moderado.

Para as restantes 101 amostras o resultado NIPT foi inconclusivo. Estes resultados, ou a falta deles, podem ser justificados através de vários fatores como: baixa fração fetal, o índice de massa corporal baixo ou demasiado elevado e a qualidade/quantidade de amostra, não sendo nenhum deles relacionado com fatores laboratoriais.

Foram analisados os vários parâmetros separadamente de forma a justificar os resultados inconclusivos, começando pela FF que indica a percentagem de DNA fetal que é encontrado em circulação no sangue materno, cujo valor mínimo deverá ser de 3% para que os resultados sejam fidedignos.

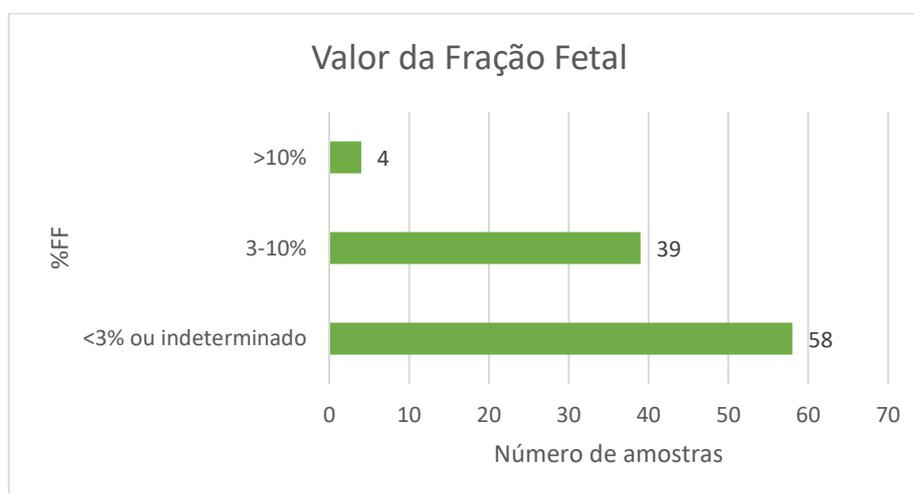


Gráfico II - Percentagem da FF relativamente aos resultados inconclusivos

No gráfico II, os valores da FF foram divididos em menores que 3% ou indeterminados, entre 3-10% e superiores a 10%. Dos 101 resultados inconclusivos, 58 apresentavam uma FF fetal inferior a 3% ou indeterminada, quer por falha na comparação entre amostras pelo sistema, quer por falta de amplificação da mesma.

O Índice de Massa Corporal (IMC) é outro fator que influencia o resultado, porque grávidas com IMC elevado tendem a ter uma maior destruição a nível celular

o que leva a um aumento do DNA materno e consequentemente a uma sub-representação do DNA fetal em circulação no sangue materno. O IMC dito normal encontra-se entre os 17 e os 25, sendo que valores superiores indicam que o indivíduo se encontra com excesso de peso.

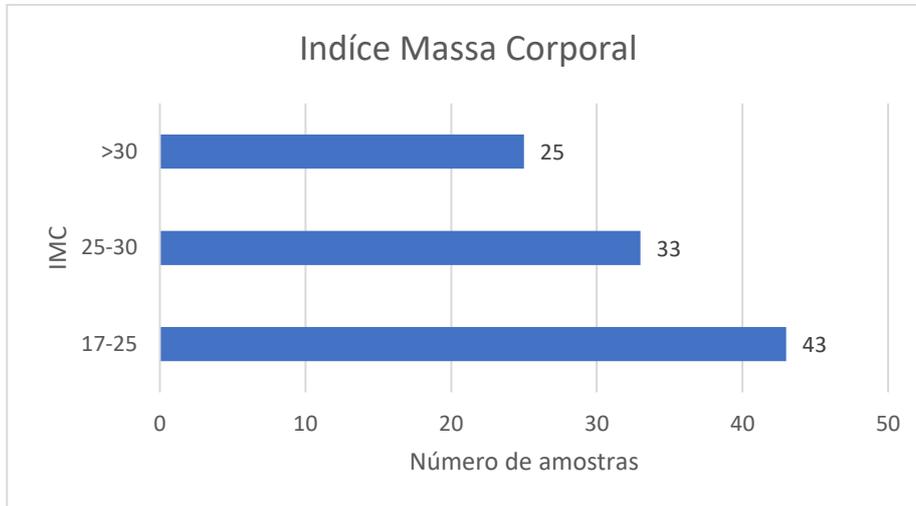


Gráfico III - IMC das restantes gestantes cujo resultado NIPT foi inconclusivo

No gráfico III é possível observar que 58 das 101 gestantes apresentavam o IMC acima de 25, sendo que a técnica é executada por norma até um valor de IMC igual a 30. No entanto, dessas 58 grávidas, 25 tinham o seu IMC acima de 30, sendo que estão aqui ainda incluídas 4 gestantes cujo seu IMC é superior a 40. O IMC da gestante é algo a ter em atenção, sendo que o risco de falhar é progressivamente maior quanto mais elevado for o IMC da gestante. Por norma o valor aceitável de IMC é entre 17 e 30, no entanto, em caso de valores superiores, fica ao critério do clínico decidir se prossegue ou não com o teste NIPT, tendo sempre em consideração que existe uma probabilidade elevada de não obtenção de resultados. Neste momento, no LCG-FMUC tem experiência positiva em testes em grávidas cujo IMC é superior a 30, mas inferior a 40.

A qualidade e a quantidade da amostra são ainda outros parâmetros que podem influenciar os resultados do teste NIPT. Em relação à quantidade, não foi elaborado um gráfico pois este valor esteve sempre dentro dos parâmetros normais, cujo valor *standard* é de 4,5ml.

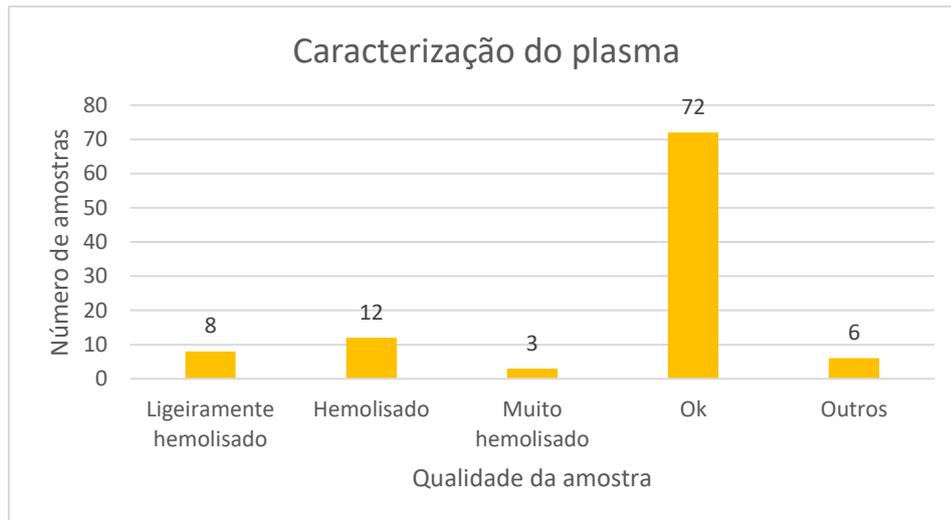


Gráfico IV - Qualidade das amostras referentes aos resultados inconclusivos

O gráfico IV representa a qualidade do plasma das 101 amostras cujo resultado foi inconclusivo. Dessas 101 amostras, 29 não se encontrava no estado favorável de qualidade.

Este fator está relacionado com a recolha da amostra no hospital, no entanto, problemas nesta etapa, como é o caso de sangue hemolisado, no qual ocorre destruição das células, podem originar resultados inconclusivos (Gráfico IV). É possível verificar que o plasma se encontra hemolisado quando, após a separação por fases, apresenta uma tonalidade rosa/avermelhada, devido à presença de glóbulos vermelhos e/ou hemoglobinas. No entanto, não são estas que acabam por influenciar os resultados, mas sim os glóbulos brancos, que ao serem destruídos libertam para o exterior o DNA genómico materno, levando assim a um aumento do DNA materno e uma diluição do cfDNA fetal, diminuindo, conseqüentemente, a fração fetal.

Após a avaliação de cada parâmetro individualmente foi elaborado um diagrama de Venn, onde é possível visualizar a quantidade de resultados inconclusivos que foram influenciados por um ou mais parâmetros em conjunto: IMC>30, FF<3% ou indeterminada e qualidade do plasma que tivesse qualquer tipo de caracterização fora do normal (Fig. 22).

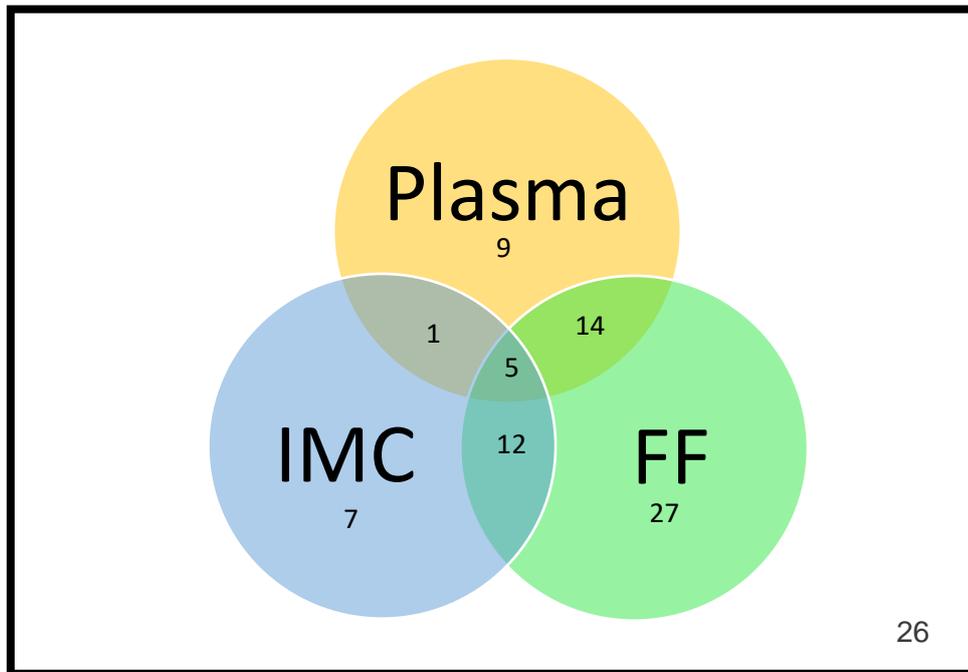


Figura 22 - Conjunto dos resultados inconclusivos representados num diagrama de Venn

Das 101 amostras analisadas cujo resultado NIPT foi inconclusivo, 75 continham pelo menos um dos parâmetros analisados fora da qualificação adequada para se obter resultados fiáveis através da técnica de NGS.

No entanto, 26 dos resultados inconclusivos não mostraram nenhuma alteração significativa nos 3 parâmetros analisados, contudo, 9 desses 26 resultados apresentavam suspeita de existência de uma terceira fonte de DNA que poderá estar relacionada com:

- Doação de óvulos, pelo facto de o óvulo doado transportar consigo o DNA mitocondrial da dadora, sendo detetado o DNA materno, o DNA fetal e o DNA da dadora;
- Transplante de órgãos de um dador do sexo masculino pode levar a que exista sequências específicas do cromossoma Y em circulação, levando a possíveis erros na determinação do sexo fetal. Além disso, irá existir um terceiro genoma em circulação, o que poderá induzir o teste a erro (Hui, 2016);
- Transfusões de sangue recentes, pois, existe DNA exógeno proveniente de um dador em circulação no organismo materno;
- Doentes oncológicos, porque os tumores malignos libertam *cell tumor DNA* que é detetado pelo teste NIPT, influenciando os resultados (Hui, 2016);
- Gestação gemelar;

- Mosaicismo, pois, o teste NIPT não é capaz de diferenciar o material genético proveniente do feto do material genético proveniente da placenta, podendo gerar falsos positivos e falsos negativos (*Module 2: Patient Selection and Performance Criteria, 2021*).

Quando assim é, deverá executar-se outro tipo de testes, amniocentese ou biopsia das vilosidades coriônicas.

Até à data não foram detetados possíveis erros durante a execução do protocolo, podendo os restantes 17 casos aparentemente sem alterações significativas para que o resultado fosse inconclusivo, estar relacionados com toma de medicação por parte da gestante ou outras condições biológicas.

É ainda de salientar, que o tempo de gestação da grávida é relevante para a execução da técnica, não devendo a mesma ser realizada com um tempo de gestação inferior a 10 semanas, correndo o risco de a FF ser insuficiente levando a um resultado inconclusivo. Neste trabalho, nenhuma gestante foi sujeita ao teste NIPT com uma idade gestacional inferior a 10 semanas.

## 5. Conclusão

Ao longo do trabalho foi possível perceber que existem técnicas de diagnóstico não invasivo que permitem detetar algumas alterações durante o desenvolvimento fetal. No entanto, até à descoberta do cffDNA em circulação no sangue materno, qualquer dúvida gerada durante a execução de testes não invasivos teria de ser confirmada por um teste de diagnóstico invasivo. Com a tecnologia do NIPT, foi possível oferecer o teste a um número maior de grávidas em risco de aneuploidias bem como diminuir o número de testes invasivos que, por norma são menos aceites pelos progenitores pelo facto de existir, mesmo que muito reduzida, a probabilidade de potencializarem uma complicação na gravidez ou até mesmo o aborto.

Através da implementação desta técnica é possível detetar a presença de aneuploidias em gestações de risco moderado sem que estas tenham de passar diretamente para um diagnóstico invasivo. Contudo, existem alguns critérios estabelecidos para que este teste seja oferecido, critérios esses que podem ser alterados pela maternidade em concordância com o laboratório que executa a análise.

Relativamente ao custo-benefício da implementação do teste NIPT, conclui-se que, apesar de este ter um valor mais elevado que os restantes testes, quer invasivos como não invasivos, para quem suporta os custos (Portugal, SNS), esses custos extra acabam por se refletir numa diminuição de nascimentos de indivíduos portadores de trissomia e numa diminuição do uso testes invasivos.

Em relação aos resultados obtidos, em 846 testes NIPT obtiveram-se 731 resultados negativos, o que significa que foram evitadas 731 aplicações de testes invasivos para diagnóstico de trissomias. Obtiveram-se ainda 14 fetos com teste positivo para a presença de aneuploidias, que apesar de necessitarem de uma posterior confirmação através de um teste invasivo, em casos positivos pode-se aplicar a interrupção médica da gravidez e evitar o nascimento de fetos portadores de trissomia. Em relação aos 101 inconclusivos, estes têm a oportunidade de repetir o teste NIPT se o médico assim o entender.

Contudo, e como já foi referido anteriormente, esta técnica apresenta algumas limitações:

- É um teste de rastreio, e resultados positivos exigem confirmação através de testes invasivos;

- Não é aplicável em gestações múltiplas, dadoras de óvulos (no caso da técnica NIPT usada no LCG-FMUC) ou de mosaicismo;
- O resultado pode ser condicionado negativamente por parâmetros externos: IMC, FF, estado clínico da grávida e qualidade da amostra sanguínea.

Além disso, é importante referir que o teste NIPT é direcionado para a deteção de aneuploidias ligadas aos cromossomas 13, 18 e 21, e por isso, um teste NIPT negativo não significa numa primeira instância que o feto seja saudável, podendo apresentar problemas ligados a outros cromossomas.

## Bibliografia

- Aite, L. *et al.* (2006) "Mothers' adaptation to antenatal diagnosis of surgically correctable anomalies," *Early Human Development*, 82(10), pp. 649–653. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2005.12.010.
- Akolekar, R. *et al.* (2015) "Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis," *Ultrasound Obstet Gynecol.* John Wiley & Sons, Ltd, 45(1), pp. 16–26. doi: 10.1002/uog.14636.
- Alberry, M. S. *et al.* (2021) "Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond," *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* Elsevier Ireland Ltd, 258, pp. 424–429. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.01.008.
- Allyse, M. *et al.* (2015a) "Non-invasive prenatal testing: A review of international implementation and challenges," *International Journal of Women's Health.* Dove Medical Press Ltd, pp. 113–126. doi: 10.2147/IJWH.S67124.
- Allyse, M. *et al.* (2015b) "Non-invasive prenatal testing: A review of international implementation and challenges," *International Journal of Women's Health.* Dove Medical Press Ltd, pp. 113–126. doi: 10.2147/IJWH.S67124.
- Almeida, P. *et al.* (2014) *The new era of prenatal screening, The new era of prenatal screening.* Available at: <http://www.fspog.com/fotos/editor2/14-aogp-d-13-00076.pdf> (Accessed: June 11, 2021).
- Balbeur, S. *et al.* (2016) "Trisomy rescue mechanism: The case of concomitant mosaic trisomy 14 and maternal uniparental disomy 14 in a 15-year-old girl," *Clinical Case Reports.* Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 4(3), pp. 265–271. doi: 10.1002/ccr3.501.
- Bardsley, M. Z. *et al.* (2013) "47,XYY syndrome: Clinical phenotype and timing of ascertainment," *Journal of Pediatrics*, 163(4), pp. 1085–1094. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.05.037.
- Bayón, J. C. *et al.* (2019) "The consequences of implementing non-invasive prenatal testing with cell-free foetal DNA for the detection of Down syndrome in the Spanish National Health Service: A cost-effectiveness analysis," *Cost Effectiveness and Resource Allocation.* BioMed Central Ltd., 17(1). doi: 10.1186/s12962-019-0173-8.
- Benachi, A. *et al.* (2020) "Understanding attitudes and behaviors towards cell-free DNA-based noninvasive prenatal testing (NIPT): A survey of European health-care providers," *European Journal of Medical Genetics.* Elsevier Masson SAS, 63(1), p. 103616. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.01.006.
- Bernal, L. M. and López, G. (2014) "Diagnóstico prenatal: retrospectiva," *NOVA publ. cient*, 12(21), pp. 23–36. doi: 10.22490/24629448.1838.
- BISCO (2017) "Instructions for Use Content : instructions for Use," *Microbiologics*, (October), pp. 1–7. Available at: [https://v3.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/images/producten/imp/quality\\_control/english\\_lyfo\\_disk\\_kwik-stik\\_kwik-stik\\_plus\\_instructions\\_for\\_use.pdf](https://v3.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/images/producten/imp/quality_control/english_lyfo_disk_kwik-stik_kwik-stik_plus_instructions_for_use.pdf).
- Brody, T. (2016) "Biomarkers," in *Clinical Trials.* Elsevier, pp. 377–419. doi: 10.1016/B978-0-12-804217-5.00019-9.
- Butler, J. M. (2012) "Single Nucleotide Polymorphisms and Applications," in *Advanced Topics in Forensic DNA Typing.* Elsevier, pp. 347–369. doi: 10.1016/b978-0-12-374513-2.00012-9.
- CABROL, S. (2007) *Orphanet: Síndrome de Turner.* Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=PT&data\\_id=44&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=sindrome-de-turner&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Sndrome-de-Turner&title=S%E7ndrome de](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=PT&data_id=44&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=sindrome-de-turner&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Sndrome-de-Turner&title=S%E7ndrome de)

- Turner&search=Disease\_Search\_Simple (Accessed: June 11, 2021).
- Caldwell, S. *et al.* (2020) "Henry Ford Health System Henry Ford Health System Henry Ford Health System Scholarly Commons Henry Ford Health System Scholarly Commons Research Articles Research Administration." doi: 10.1002/ajmg.a.61801.
- Cereda, A. and Carey, J. C. (2012) "The trisomy 18 syndrome," *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central, p. 81. doi: 10.1186/1750-1172-7-81.
- Cheng, Y. K. Y. *et al.* (2018) "Women's preference for non-invasive prenatal DNA testing versus chromosomal microarray after screening for Down syndrome: a prospective study," *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing Ltd, 125(4), pp. 451–459. doi: 10.1111/1471-0528.15022.
- Chiu, E. K. L., Hui, W. W. I. and Chiu, R. W. K. (2018) "cfDNA screening and diagnosis of monogenic disorders - where are we heading?," *Prenatal Diagnosis*. John Wiley and Sons Ltd, 38(1), pp. 52–58. doi: 10.1002/pd.5207.
- Chung, E. K. (2018) "Down syndrome (Trisomy 21)," in *The 5-Minute Pediatric Consult, 8th Edition*. Wolters Kluwer Health, pp. 306–307. doi: 10.1093/med/1.1.med-9780192628961-div1-005013.
- "Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy" (2015) *Obstetrics and gynecology*, 126(3), pp. e31–e37. doi: 10.1097/AOG.0000000000001051.
- Conlin, L. K. *et al.* (2010) "Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis," *Human Molecular Genetics*. Oxford Academic, 19(7), pp. 1263–1275. doi: 10.1093/hmg/ddq003.
- Coral Barreda Bonis, A., González Casado, I. and Paz Madrid España, L. (2019) *Síndrome de Turner*. Available at: [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/) (Accessed: June 26, 2021).
- Cui, W. *et al.* (2019) "Evaluation of non-invasive prenatal testing to detect chromosomal aberrations in a Chinese cohort," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc., 23(11), pp. 7873–7878. doi: 10.1111/jcmm.14614.
- Cui, X. *et al.* (2018) "A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment," *Intractable and Rare Diseases Research*. International Advancement Center for Medicine and Health Research, pp. 223–228. doi: 10.5582/irdr.2017.01056.
- D'Aversa, E. *et al.* (2018) "Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR," *Molecular Medicine*. BioMed Central Ltd., 24(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s10020-018-0016-7.
- Decreto-Lei n.º 48/95* (no date). Available at: <https://dre.pt/web/guest/legislacao-consolidada-/lc/107981223/201708230300/73474042/element/diploma> (Accessed: June 6, 2021).
- Delhanty, J. DA (2018) "Origins of Human Aneuploidy," *eLS*, pp. 1–8. doi: 10.1002/9780470015902.a0021444.pub2.
- Deng, N. *et al.* (2017) "Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility," *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.22372.
- Edwards' syndrome (trisomy 18) - NHS - NHS* (2020). Available at: <https://www.nhs.uk/conditions/edwards-syndrome/> (Accessed: July 18, 2020).
- Finning, K. M. and Chitty, L. S. (2008) "Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice," *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. W.B. Saunders, 13(2), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.siny.2007.12.007.
- García-Pérez, L. *et al.* (2018) "Cost-effectiveness of cell-free DNA in maternal blood testing for prenatal detection of trisomy 21, 18 and 13: a systematic review," *European Journal of Health Economics*. Springer Verlag, 19(7), pp. 979–991. doi: 10.1007/s10198-017-0946-y.
- Grati, F. R. (2016) "Editorial Implications of fetoplacental mosaicism on cell-free DNA testing: a review of a common biological phenomenon," *Ultrasound Obstet Gynecol*. John Wiley & Sons,

Ltd, 48(4), pp. 415–423. doi: 10.1002/uog.15975.

Gregg, A. R. *et al.* (2016) “Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: A position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics,” *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 18(10), pp. 1056–1065. doi: 10.1038/gim.2016.97.

Homem Melo Marques, S. (2012) *ADN fetal livre no sangue materno e pré-natal não invasivo - uma realidade*. Available at: [http://www.fspog.com/fotos/editor2/1\\_ficheiro\\_609.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/1_ficheiro_609.pdf) (Accessed: July 15, 2021).

Howell, D. S. *et al.* (2010) *Orphanet: Trissomia X*. Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=PT&data\\_id=1231&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=triplo-x&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Grupo de doen%EA7as relacionadas=Trissomia-X&title=Trissomia X&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=PT&data_id=1231&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=triplo-x&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Grupo de doen%EA7as relacionadas=Trissomia-X&title=Trissomia X&search=Disease_Search_Simple) (Accessed: June 11, 2021).

Hu, Z. *et al.* (2021) “The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion,” *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier, 157, p. 103166. doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2020.103166.

Hui, L. (2016) “Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA – New implications for maternal health,” *Obstetric Medicine*. SAGE Publications Inc., pp. 148–152. doi: 10.1177/1753495X16652007.

Illumina (2019) “MiSeq System Guide.” Available at: [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). (Accessed: July 11, 2021).

*Jacobs Syndrome - PubMed* (2020). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491631/> (Accessed: June 5, 2021).

Jin, Y. *et al.* (2016) “Catfish genomic studies: Progress and perspectives,” in *Genomics in Aquaculture*. Elsevier Inc., pp. 73–104. doi: 10.1016/B978-0-12-801418-9.00004-4.

Kesler, S. R. (2007) “Turner Syndrome,” *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. NIH Public Access, pp. 709–722. doi: 10.1016/j.chc.2007.02.004.

Kotsopoulou, I. *et al.* (2015) “Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis,” *Diagnosis*. De Gruyter, 2(3), pp. 141–158. doi: 10.1515/DX-2015-0002.

Kozma, C. (2014) *O que é síndrome de Down?*

Kuznetsova, M. A. *et al.* (2015) “Patau syndrome,” *Voprosy Prakticheskoi Pediatrii*. Dynasty Publishing House, 10(6), pp. 90–93. doi: 10.1176/appi.neuropsych.19.2.201.

Lanfranco, F. *et al.* (2004) “Klinefelter’s syndrome,” *Lancet*. Elsevier B.V., pp. 273–283. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16678-6.

Martinhago, C. D. *et al.* (2006) “Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno,” *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, 28(3), pp. 190–194. doi: 10.1590/s0100-72032006000300009.

Minear, M. A. *et al.* (2015) “Global perspectives on clinical adoption of NIPT,” *Prenatal Diagnosis*. John Wiley and Sons Ltd, 35(10), pp. 959–967. doi: 10.1002/pd.4637.

Miragaia, T. M. *et al.* (2020) “Testes pré-natais não invasivos para rastreio de aneuploidias: revisão baseada na evidência,” *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. Associação Portuguesa de Medicina Geral e Familiar, 36(3), pp. 253–264. doi: 10.32385/rpmgf.v36i3.12547.

*Module 2: Patient Selection and Performance Criteria* (2021). Available at: <https://www.stgeorges.nhs.uk/education-modules-for-healthcare-professionals/> (Accessed: June 6, 2021)

Munné, S. *et al.* (1994) “Chromosome Mosaicism in Human Embryos,” *Biology of Reproduction*. Oxford University Press (OUP), 51(3), pp. 373–379. doi: 10.1095/biolreprod51.3.373.

Navarro Rodríguez, M., Carmona Sánchez, E. and Rodríguez Pulido, M. (2015) “Determinación del sexo fetal en ecografía del primer trimestre,” *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. Ediciones Doyma, S.L., 58(5), pp. 227–230. doi: 10.1016/j.pog.2015.01.002.

Nieschlag, E. (2013) “Klinefelter-Syndrom,” *Deutsches Arzteblatt International*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 110(20), pp. 347–353. doi: 10.3238/arztebl.2013.0347.

Norwitz, E. R. and Levy, B. (2013) “Noninvasive prenatal testing: the future is now.,” *Reviews in obstetrics & gynecology*. MedReviews, LLC, 6(2), pp. 48–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466384> (Accessed: July 3, 2021).

Van Opstal, D. *et al.* (2018) “Unexpected finding of uniparental disomy mosaicism in term placentas: Is it a common feature in trisomic placentas?,” *Prenatal Diagnosis*. John Wiley and Sons Ltd, 38(12), pp. 911–919. doi: 10.1002/pd.5354.

*Orphanet: Trissomia 21* (2000). Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=PT&data\\_id=116&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=sindrome-de-down&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Trissomia-21&title=Trissomia 21&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=PT&data_id=116&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=sindrome-de-down&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Trissomia-21&title=Trissomia 21&search=Disease_Search_Simple) (Accessed: June 11, 2021).

Otter, M., Schrander-Stumpel, C. T. and Curfs, L. M. (2010) “Triple X syndrome: A review of the literature,” *European Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 265–271. doi: 10.1038/ejhg.2009.109.

Pinto Júnior, W. (2002) “Diagnóstico pré-natal,” *Ciência & Saúde Coletiva*. FapUNIFESP (SciELO), 7(1), pp. 139–157. doi: 10.1590/s1413-81232002000100013.

*Portal do INE* (2021). Available at: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0008254&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008254&contexto=bd&selTab=tab2) (Accessed: March 10, 2021).

Powell-Hamilton, N. N. (2018) *Síndrome de Klinefelter (47,XXY) - Pediatria - Manuais MSD edição para profissionais*. Available at: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/pediatria/anomalias-geneticas-e-cromossomicas/sindrome-de-klinefelter-47-xy> (Accessed: June 11, 2021).

Queremel Milani, D. A. and Chauhan, P. R. (2020) *Genetics, Mosaicism, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644619> (Accessed: June 4, 2021).

Ray, A. *et al.* (2018) “Risk of Down syndrome birth: Consanguineous marriage is associated with maternal meiosis-II nondisjunction at younger age and without any detectable recombination error,” *American Journal of Medical Genetics Part A*. Wiley-Liss Inc., 176(11), pp. 2342–2349. doi: 10.1002/ajmg.a.40511.

Re, L. and Birkhoff, J. M. (2015) “The 47,YYY syndrome, 50 years of certainties and doubts: A systematic review,” *Aggression and Violent Behavior*. Elsevier Ltd, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.avb.2015.02.003.

Renga, B. (2018) “Non invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy using cell free fetal DNA,” *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 5–8. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.033.

Rey, R., Josso, N. and Racine, C. (2020) “Sexual Differentiation,” *Endotext*. MDText.com, Inc., pp. 1–83. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279001/> (Accessed: September 12, 2021).

ROCHE, D. O. (2005) *Orphanet: Trissomia 18*. Available at: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=PT&data\\_id=339&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=trissomia-18&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Trissomia-18&title=Trissomia 18&search=Disease\\_Search\\_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=PT&data_id=339&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=trissomia-18&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Grupo de doen%E7as relacionadas=Trissomia-18&title=Trissomia 18&search=Disease_Search_Simple) (Accessed: June 11, 2021).

Romão, R. M. *et al.* (2012) “Utilização de ácidos nucleicos fetais livres no plasma materno para

- o diagnóstico pré-natal: Realidade do Brasil neste cenário,” *Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)*. No longer published by Elsevier, 58(5), pp. 615–619. doi: 10.1016/S2255-4823(12)70258-8.
- Sahota, D. S. (2015) “Noninvasive Testing for Fetal Aneuploidy: A Hong Kong Perspective,” *AJOB Empirical Bioethics*. Taylor and Francis Inc., pp. 106–110. doi: 10.1080/23294515.2014.993103.
- Saraiva, J. M. (2013) “*Genética Médica: conceitos elementares e aplicações frequentes*”-2013 1-A especificidade da genética médica e 2-Anomalias congénitas.
- van Schendel, R. V. *et al.* (2014) “Attitudes of pregnant women and male partners towards non-invasive prenatal testing and widening the scope of prenatal screening,” *European journal of human genetics : EJHG*, 22(12), pp. 1345–1350. doi: 10.1038/ejhg.2014.32.
- Silva, F. *et al.* (2015) “Preservação da fertilidade feminina – novos desafios,” *Acta Obstet Ginecol Port*, 9(2), pp. 154–157.
- Síndrome de Patau* (2014). Available at: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2014000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2014000100009&script=sci_arttext) (Accessed: July 18, 2020).
- single nucleotide polymorphism / SNP | Learn Science at Scitable* (2014). Available at: <https://www.nature.com/scitable/definition/snp-295/> (Accessed: June 5, 2021).
- Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* (2014). Available at: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Single-Nucleotide-Polymorphisms> (Accessed: June 5, 2021).
- Smet, M. E., Scott, F. P. and McLennan, A. C. (2020) “Discordant fetal sex on NIPT and ultrasound,” *Prenatal Diagnosis*. John Wiley and Sons Ltd, pp. 1353–1365. doi: 10.1002/pd.5676.
- Soediono, B. (2014) *Non-invasive Prenatal Testing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines, Non-invasive Prenatal Testing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines*. Edited by Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press. Available at: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009> (Accessed: January 16, 2021).
- Song, J. *et al.* (2016) “A family with Robertsonian translocation: A potential mechanism of speciation in humans,” *Molecular Cytogenetics*. BioMed Central Ltd., 9(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s13039-016-0255-7.
- Sood, B. and Clemente Fuentes, R. W. (2021) *Jacobs Syndrome, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491631> (Accessed: June 11, 2021).
- Tecnologia de célula de fluxo padronizada* (2021). Available at: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/patterned-flow-cells.html> (Accessed: September 12, 2021).
- Toutain, J. *et al.* (2018) “Confined placental mosaicism revisited: Impact on pregnancy characteristics and outcome,” *PLoS ONE*. Public Library of Science. doi: 10.1371/journal.pone.0195905.
- Trisomi 13-syndromet - Socialstyrelsen* (2008). Available at: <https://www.socialstyrelsen.se/stod-i-arbetet/sallsynta-halsotillstand/trisomi-13-syndromet/> (Accessed: June 26, 2021).
- Trisomi 18-syndromet - Socialstyrelsen* (2015). Available at: <https://www.socialstyrelsen.se/stod-i-arbetet/sallsynta-halsotillstand/trisomi-18-syndromet/> (Accessed: June 26, 2021).
- Trovó De Marqui, A. B. (2015) “Turner syndrome and genetic polymorphism: A systematic review,” *Revista Paulista de Pediatria*. Sao Paulo Pediatric Society, pp. 364–371. doi: 10.1016/j.rpped.2014.11.014.

- VERLOES, A. (2008) *Trissomia 13, Orphanet*. Available at: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=PT&Expert=3378](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=PT&Expert=3378) (Accessed: June 11, 2021).
- Wiland, E. *et al.* (2020) "How much, if anything, do we know about sperm chromosomes of Robertsonian translocation carriers?," *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 4765–4785. doi: 10.1007/s00018-020-03560-5.
- Yamamoto, E. *et al.* (2020) "Genetic mapping in autohexaploid sweet potato with low-coverage NGS-based genotyping data," *G3: Genes, Genomes, Genetics*. Genetics Society of America, 10(8), pp. 2661–2670. doi: 10.1534/g3.120.401433.
- Yin, L. *et al.* (2019) "Noninvasive prenatal testing detects microdeletion abnormalities of fetal chromosome 15," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. John Wiley and Sons Inc., 33(6). doi: 10.1002/jcla.22911.
- Youssoufian, H. and Pyeritz, R. E. (2002) "Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans," *Nature Reviews Genetics*, pp. 748–758. doi: 10.1038/nrg906.
- Zhao, W. W. *et al.* (2015) "Robertsonian translocations: An overview of 872 Robertsonian translocations identified in a diagnostic laboratory in China," *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0122647.