



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Rastreio Pré-Natal Não Invasivo Que se perspectiva?

Carolina Quintela Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho
Co-orientador: Doutor Carlos Eduardo Alcobia C. F. Catalão

Covilhã, maio de 2018

Dedicatória

Aos meus pais,
pelo apoio incondicional e
por acreditarem sempre nas minhas capacidades.
Porque sem eles nada seria possível.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor José Alberto Fonseca Moutinho, pela sua disponibilidade, prontidão, exigência e crítica construtiva durante a elaboração desta dissertação.

Ao Dr. Carlos Catalão pela disponibilidade que demonstrou para me ajudar a elaborar esta dissertação.

Aos meus pais, pelo esforço e dedicação, pelo apoio incondicional e orgulho constante ao longo dos anos, por permitirem que todos os meus sonhos se concretizem e por me terem tornado na pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão, pela cumplicidade, por todas as brincadeiras e pelo exemplo que me deu ao longo dos anos.

À minha prima, por todas as gargalhadas, pela confiança inquestionável e por dar significado à palavra irmã.

À minha restante família, pelo apoio e boa disposição constante, pela compreensão de todas as ausências, por estarem sempre presentes e pelo exemplo de união.

Aos meus amigos, em especial à Vanessa, pela alegria, pelos momentos partilhados, pelas vitórias alcançadas e por se tornarem numa segunda família.

À Universidade da Beira Interior, à Faculdade de Ciências da Saúde e a todos os que contribuíram para a minha formação, pelos ensinamentos, dedicação e disponibilidade.

À Covilhã, por me acolher durante estes 6 anos e por permitir a construção de amizades e memórias inesquecíveis.

Prefácio

“All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them.”

Walt Disney

Resumo

Introdução: Nos dias de hoje existe uma grande preocupação no que respeita ao rastreio e diagnóstico pré-natal de cromossomopatias. No entanto, o diagnóstico genético pré-natal realizado na prática atual depende da obtenção de células fetais através de procedimentos invasivos, como a amniocentese e a biópsia das vilosidades coriônicas. Tendo em conta os riscos para a gravidez associados a estes procedimentos têm sido procuradas alternativas não invasivas aos métodos de rastreio atuais que permitam uma deteção mais exata com taxas de falsos positivos menores de forma a diminuir a necessidade de procedimentos invasivos e, por conseguinte, o número de abortos iatrogénicos. A descoberta de ADN fetal livre na circulação materna tornou possível o desenvolvimento de um novo método de rastreio de aneuploidias fetais, o chamado teste pré-natal não invasivo.

Objetivos: Conhecer a evidência científica atual sobre a aplicabilidade dos testes de rastreio e de diagnóstico pré-natais; perceber os benefícios e limitações da introdução do novo teste pré-natal não invasivo (NIPT) na prática clínica e refletir sobre as suas perspetivas futuras.

Metodologia: Foi feita uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos e de revisão entre agosto de 2017 e dezembro de 2017, na base de dados PubMed com as seguintes palavras-chave: “*noninvasive prenatal testing*”, “*cell-free fetal DNA*”, “*aneuploidy screening*”, “*prenatal diagnosis*”, “*chorionic villus sampling*” e “*amniocentesis*”. A pesquisa foi restringida a literatura publicada na língua inglesa nos últimos 10 anos e foram selecionados os artigos com aparente relevância ao tema com base no título e abstract.

Resultados: O NIPT apresenta uma sensibilidade e especificidade superiores aos atuais métodos de rastreio pré-natais utilizados, o que leva a uma menor necessidade de procedimentos diagnósticos, atualmente invasivos. Além disso, permite também o rastreio de aneuploidias dos cromossomas sexuais. Contudo, o seu custo é demasiado elevado para que possa ser introduzido como método de rastreio universal.

Conclusão: A análise do cfDNA é o teste do futuro para o rastreio pré-natal, no entanto, há ainda muitas questões que precisam de respostas, especialmente a nível económico. Assim, é fundamental que a investigação nesta área continue, uma vez que o teste tem potencial para ser incorporado nos algoritmos de rastreio atualmente em prática ou mesmo substituí-los.

Palavras-chave

Rastreio aneuploidias, diagnóstico pré-natal, métodos não invasivos, ADN fetal livre.

Abstract

Introduction: Nowadays, there is a great concern regarding the prenatal screening and diagnosis of chromosomal disorders. However, prenatal genetic diagnosis currently relies on the examination of fetal cells obtained through invasive procedures, such as amniocentesis and chorionic villus sampling. Taking into account the risks to pregnancy associated with these procedures, non-invasive alternatives have been sought for current screening methods that allow more accurate detection with lower false positive rates in order to reduce the need for invasive procedures and, therefore, the number of iatrogenic abortions. The discovery of free fetal DNA in the maternal circulation made possible the development of a new method of screening for fetal aneuploidies, the so-called non-invasive prenatal test.

Objectives: Know the current scientific evidence on the applicability of prenatal screening and diagnostic tests; understand the benefits and limitations of introducing the new noninvasive prenatal test (NIPT) into clinical practice and reflect on its future perspectives.

Methods: A bibliographic search of scientific and review articles was carried out between august 2017 and december 2017 in the PubMed database with the following keywords: "noninvasive prenatal testing", "cell-free fetal DNA", "aneuploidy screening", "prenatal diagnosis", "chorionic villus sampling" and "amniocentesis". The research was restricted to the literature published in the English language in the last 10 years and the articles with apparent relevance to the theme were selected based on the title and abstract.

Results: NIPT has a higher sensitivity and specificity than the current prenatal screening methods used, which leads to a less need for diagnostic procedures, currently invasive. In addition, it also allows the screening for sex chromosome aneuploidies. However, it is too expensive to be introduced as a universal screening method.

Conclusion: The analysis of cfDNA is the test of the future for prenatal screening, however, there are still many questions that require answers, especially at an economic level. Thus, it is critical that research in this area continues, since the test has the potential to be incorporated into the screening algorithms currently in place or even replace them.

Keywords

Screening for aneuploidies, prenatal diagnosis, non-invasive methods, cell-free fetal DNA.

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Prefácio.....	vii
Resumo	ix
Palavras-chave	x
Abstract.....	xi
Keywords	xii
Índice	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos.....	xix
1. Introdução	1
1.1. Objetivos	2
2. Metodologia.....	3
3. Resultados.....	5
3.1. Rastreo pré-natal	5
3.1.1. 1º Trimestre	5
3.1.2. 2º Trimestre	6
3.1.3. 1º e 2º Trimestres Combinados.....	7
3.1.3.1. Rastreo Integrado.....	7
3.1.3.2. Rastreo Sequencial - modelo passo a passo e contingente.....	8
3.2. Diagnóstico pré-natal	9
3.2.1. Biópsia das Vilosidades Coriônicas.....	9
3.2.2. Amniocentese	10
3.2.3. Cordocentese.....	10
3.3. Teste pré-natal não invasivo	11
3.3.1. Fração Fetal	11
3.3.2. Aplicações e performance clínica	13

3.3.2.1.	Aneuploidias autossômicas	13
3.3.2.2.	Aneuploidias dos cromossomas sexuais.....	13
3.3.2.3.	Gravidez múltipla	14
3.3.2.4.	Outras	15
3.3.3.	Comparação com aos atuais métodos.....	15
3.3.4.	Influência nos procedimentos invasivos	16
3.3.5.	Prática clínica.....	16
4.	Discussão	21
5.	Conclusão - Perspetivas Futuras	23
6.	Lista de Referências.....	25

Lista de Figuras

Figura 1. Modelos propostos para a implementação do NIPT na prática clínica.....	16
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos fetos euploides e aneuploides no rastreo do 1º trimestre6

Tabela 2. Características dos testes de rastreo de aneuploidias8

Lista de Acrónimos

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
TN	Translucência da Nuca
BVC	Biópsia das Vilosidades Coriônicas
NIPT	Teste pré-natal não invasivo
RCPT	Rastreo Combinado do Primeiro Trimestre
B-hCG	Gonadotrofina Coriônica humana B
PAPP-A	Proteína Plasmática A associada à Gravidez
DV	Ducto Venoso
T21	Trissomia 21
T18	Trissomia 18
T13	Trissomia 13
AFP	Alfafetoproteína
cfDNA	ADN livre
FF	Fração Fetal
IMC	Índice de Massa Corporal
ACS	Aneuploidia Cromossomas Sexuais

1. Introdução

A avaliação do risco de anomalias cromossômicas no primeiro trimestre de gravidez desempenha um papel importante na atual vigilância pré-natal¹.

Anomalias cromossômicas ocorrem em aproximadamente 1 em 150 nados vivos. No entanto, a sua prevalência é maior na fase inicial da gestação uma vez que as aneuploidias são responsáveis por um grande número de perdas precoces de gravidez².

A incidência de aneuploidias aumenta à medida que a mulher envelhece, contudo, qualquer mulher pode ser afetada independentemente da idade, raça ou etnia. Outros fatores que aumentam o risco de aneuploidia fetal incluem história prévia de um feto aneuploide e a presença de anomalias fetais².

A trissomia 21 (Síndrome de Down) é a aneuploidia autossômica mais comum, afetando 1 em cada 800 nados vivos. Apesar da incidência significativamente menor, também as trissomias 13 e 18 podem resultar em nados vivos³. Já as aneuploidias dos cromossomas sexuais apresentam uma prevalência combinada de 1:500 nados vivos, sendo, portanto, mais comuns quando comparadas de forma generalizada com as aneuploidias dos cromossomas autossômicos^{4, 5}.

Tendo em conta que as aneuploidias são causas major de morte perinatal e deficiência na infância⁶, o principal objetivo dos testes pré-natais é detetar estas alterações cromossômicas de modo a oferecer aconselhamento genético aos futuros pais⁷. Deste modo, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) recomenda que seja oferecido o rastreo não invasivo de anomalias cromossômicas fetais a todas as mulheres grávidas⁸.

Atualmente, os testes de rastreo pré-natal mais eficazes e comumente utilizados na deteção de aneuploidias fetais são baseados na idade materna, marcadores ecográficos, como a medição da translucência da nuca (TN) fetal, e marcadores séricos maternos, e são aplicados no primeiro e segundo trimestres de gravidez⁹.

Àquelas categorizadas pelo rastreo como de alto risco para aneuploidia fetal, o ACOG recomenda que sejam oferecidos testes invasivos, como amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas (BVC)⁸. Embora estes procedimentos invasivos sejam altamente exatos, são caros e também implicam riscos significativos para a saúde fetal e materna, incluído a perda de um feto saudável¹⁰.

Atendendo a estas limitações, têm sido procuradas alternativas não invasivas aos métodos de rastreo atuais que permitam uma deteção mais exata com taxas de falsos positivos menores de forma a diminuir a necessidade de procedimentos invasivos e, por conseguinte, o número de abortos iatrogénicos¹⁰.

A descoberta de ADN fetal livre na circulação materna, em 1997, tornou possível o desenvolvimento de um novo método de rastreo de aneuploidias fetais, o chamado teste pré-

natal não invasivo (NIPT), introduzido em 2011, que, desde então, tem sido utilizado na deteção das trissomias 21,18 e 13¹¹.

Este teste pode oferecer um passo intermédio entre o rastreio tradicional e o diagnóstico invasivo, uma vez que apresenta uma taxa de deteção superior associada a um menor número de falsos positivos, corrigindo assim o risco inicial que é obtido pelos métodos comumente utilizados¹². Na prática, a sua aplicação pode constituir uma medida que leve à diminuição significativa da necessidade de procedimentos invasivos¹³.

1.1. Objetivos

- Descrever os métodos de rastreio de aneuploidias comumente utilizados e a sua eficácia.
- Expor as técnicas de diagnóstico pré-natal e os riscos às quais se encontram associadas.
- Analisar a eficácia do NIPT e identificar as suas diferentes aplicações.
- Comparar os benefícios e as limitações das técnicas atualmente empregues com o NIPT.
- Perceber de que modo o rastreio através de ADN fetal livre pode influenciar a realização de procedimentos invasivos.
- Discutir a introdução do NIPT na prática clínica.
- Refletir sobre as perspectivas futuras relativamente a um diagnóstico não invasivo.

2. Metodologia

Foi feita uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos e de revisão entre agosto de 2017 e dezembro de 2017, na base de dados PubMed com as seguintes palavras-chave: “*noninvasive prenatal testing*”, “*cell-free fetal DNA*”, “*aneuploidy screening*”, “*prenatal diagnosis*”, “*chorionic villus sampling*” e “*amniocentesis*”. A pesquisa foi restringida a literatura publicada na língua inglesa nos últimos 10 anos e foram selecionados os artigos com aparente relevância ao tema com base no título e abstract.

De forma complementar foram consultados outros artigos de relevância científica para o estudo não encontrados no PubMed. Foram também analisadas as listas de referências dos artigos previamente analisados de modo a selecionar aquelas de maior pertinência para posterior estudo.

Da análise dos artigos considerados foi elaborada uma revisão descritiva da literatura.

3. Resultados

3.1. Rastreo pré-natal

O rastreo de anomalias cromossômicas fetais é parte integrante da vigilância pré-natal na maioria dos países desenvolvidos¹⁴. O processo de rastreo identifica dois grupos: o primeiro é constituído pelas grávidas com um resultado positivo, que têm um risco aumentado de ter um feto com aneuploidia, e o segundo é constituído por aquelas com um resultado negativo, que têm uma probabilidade menor para as aneuploidias avaliadas².

É muito importante reconhecer que os testes de rastreo não são diagnósticos, estando associados a falsos negativos e falsos positivos¹⁵. Por este motivo, ambos os grupos devem ser aconselhados quanto ao significado do resultado obtido e opções disponíveis face a esse mesmo resultado para que possa ser tomada uma decisão informada².

Hoje em dia existem várias opções de rastreo, com diferentes critérios de teste, a serem aplicadas em diferentes momentos da gravidez³. Os testes mais eficazes e comumente utilizados na deteção de aneuploidias fetais são aplicados no primeiro e segundo trimestres de gravidez⁹.

3.1.1. 1º Trimestre

Atualmente, o rastreo combinado do 1º trimestre (RCPT), realizado entre as 10 e as 13+6 semanas de gestação, é ainda considerado o *gold standard* para a deteção de aneuploidias fetais durante os cuidados pré-natais¹.

Na sua forma clássica, inclui a medida da TN fetal, obtida através de uma ecografia, assim como o nível sérico de dois marcadores maternos, a gonadotrofina coriônica humana B (B-hCG) e a proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A). A estimativa de risco específico é calculada associando os valores obtidos a fatores maternos, como idade, antecedentes de aneuploidia, peso, raça e número de fetos¹⁻³. O desempenho deste método pode ainda ser melhorado adicionando outros marcadores ecográficos, entre eles a presença ou ausência do osso nasal e o fluxo sanguíneo do ducto venoso (DV)¹. A tabela 1 enumera os marcadores utilizados e a sua prevalência nas diferentes aneuploidias, em comparação com fetos euploides.

Uma medida da TN aumentada, além de associada a um risco aumentado de trissomias, está também relacionada de forma independente com malformações estruturais do feto, sendo o risco de desfecho adverso da gravidez proporcional ao aumento observado na ecografia². Desta forma, a avaliação da TN fetal é um marcador importante no rastreo de defeitos cardíacos congénitos, hérnia diafragmática, algumas displasias esqueléticas, entre outras condições genéticas¹⁵.

Uma vantagem significativa do RCPT é a idade gestacional precoce a que os resultados são obtidos, o que permite às grávidas mais tempo para processar os resultados e tomar uma decisão quanto a posteriores cuidados pré-natais³. Caso o teste coloque a grávida em alto risco de feto com aneuploidia, são oferecidos testes de diagnóstico invasivos. No entanto, se o risco obtido for reduzido nenhum outro teste de rastreio é recomendado, já que a sua realização aumentará a probabilidade de obter um falso positivo².

Além do rastreio de aneuploidias, o RCPT pode estabelecer com precisão a data estimada para o parto, assim como a corionicidade em gestações múltiplas, ambas de significativa importância na prática obstétrica¹⁵.

Quanto à sua eficácia, o RCPT possui, para a trissomia 21 (T21), uma taxa de detecção de 90% com uma taxa de falsos positivos entre 3-5%. Para as trissomias 18 (T18) e 13 (T13) a taxa de detecção é de cerca de 95%¹.

Tabela 1. Características dos fetos euploides e aneuploides no rastreio do 1º trimestre ¹

	TN mediana (mm)	β-hCG mediana	PAPP-A mediana	Ossó nasal hipoplásico (%)	Inversão do fluxo no DV (%)
Euploide	1.8	1.0	1.0	0.6	3.2
Trissomia 21	3.5	2.0	0.5	63	66
Trissomia 18	5.1	0.2	0.2	55	58
Trissomia 13	3.9	0.5	0.3	35	55

3.1.2. 2º Trimestre

O rastreio bioquímico, ou rastreio dos 4 marcadores, é utilizado como primeira opção de rastreio em grávidas que se apresentam nos cuidados de saúde para vigilância pré-natal após o primeiro trimestre de gravidez, o que representa mais de 25% de todas as grávidas que recorrem aos cuidados de saúde públicos³.

Este teste, realizado entre as 15 e as 22+6 semanas de gestação, envolve a medição de 4 marcadores séricos maternos, β-hCG, alfa-fetoproteína (AFP), inibina A e estriol não conjugado. O risco estimado é obtido através da conjugação dos níveis destes 4 marcadores com fatores maternos, incluindo idade, peso, raça, número de fetos e estado da diabetes, além da idade gestacional^{2, 3, 7}.

Além da avaliação do risco de aneuploidia, este método tem também a capacidade de rastrear defeitos do tubo neural, devendo, portanto, ser realizado entre as 16 e as 18 semanas de gestação, de forma a otimizar a sua detecção².

Tendo em conta a sua realização mais tardia na gravidez, se o resultado for positivo, ou seja, se existir um risco aumentado para aneuploidias fetais, as opções disponíveis para o diagnóstico são mais limitadas uma vez que a biópsia das vilosidades coriônicas deixa de estar disponível a partir das 14 semanas de gestação².

Este rastreio é o teste múltiplo mais eficaz no 2º trimestre ⁷, com uma taxa de deteção de 81%, ligeiramente inferior ao RCPT³. O conhecimento preciso da idade gestacional no momento em que é recolhido o sangue para análise é essencial visto que uma datação incorreta diminui a exatidão dos resultados².

Alguns centros podem ainda oferecer variantes deste rastreio, excluindo a inibina A do algoritmo, ou incluindo a hCG hiperglicosilada, no entanto, estas variantes não parecem ter melhores características de rastreio³.

3.1.3. 1º e 2º Trimestres Combinados

A combinação dos rastreios utilizados no primeiro e segundo trimestres, através dos modelos integrado ou sequencial, proporciona uma taxa de deteção mais elevada do que o rastreio numa só etapa².

3.1.3.1. Rastreio Integrado

No modelo integrado de rastreio, a grávida realiza o rastreio combinado do primeiro trimestre e, posteriormente, o rastreio bioquímico do segundo, sem ter obtido os resultados do primeiro. Todos os valores obtidos são incorporados num único resultado, que é então partilhado com a grávida como uma estimativa de risco total do 2º trimestre para aneuploidias fetais^{2, 3, 6}.

A sua taxa de deteção é de 96%, com uma taxa de rastreio positivo de 5%, o que representa a taxa mais alta de todos os métodos de rastreio através do soro materno. No entanto, uma grande desvantagem desta abordagem é a disponibilização tardia dos resultados, o que limita o tempo no qual têm de ser tomadas decisões importantes quanto a futuros cuidados pré-natais³. Outra limitação é a não adesão ao segundo teste, que pode chegar aos 25%, interrompendo assim o processo de rastreio².

3.1.3.2. Rastreio Sequencial - modelo passo a passo e contingente

Este método, tal como o anterior, engloba os rastreios do primeiro e segundo trimestres, contudo, o resultado do primeiro é prontamente disponibilizado, o que permite um aconselhamento precoce^{2, 3}.

No modelo passo a passo, caso o RCPT releve um alto risco de aneuploidia, são oferecidos métodos de diagnóstico mais invasivos, e o protocolo é interrompido. Pelo contrário, se o rastreio for negativo, a paciente é informada e prossegue com o rastreio bioquímico no segundo trimestre, incorporando por fim os 2 para obter um risco global, tal como na abordagem integrada^{3, 6}.

Já no modelo contingente, as pacientes são estratificadas pelo RCPT como sendo de baixo, intermédio e alto risco. Às de baixo risco não é recomendado qualquer teste adicional e às de alto risco é oferecido um teste diagnóstico. O rastreio do 2º trimestre é apenas oferecido àquelas que apresentaram um risco intermédio, o que evita a sua realização em cerca de 75 a 80% das mulheres⁶.

Esta abordagem sequencial possui uma taxa de deteção que varia entre 80-94% com uma taxa de rastreio positivo de 5%³.

Tabela 2. Características dos testes de rastreio de aneuploidias^{2, 3}

Teste de Rastreio	Idade Gestacional (semanas)	Taxa de deteção (%)	Taxa de FP (%)	Método
RCPT	10-13 ⁺⁶	90-95	3-5	TN+ PAPP-A+ β-hCG
Rastreio Bioquímico	15-22 ⁺⁶	81	5	β-Hcg+AFP+inibina A+uE3
Rastreio Integrado	10-13 ⁺⁶ e 15-22 ⁺⁶	96	5	RCPT + RB
Rastreio Sequencial	10-13 ⁺⁶ e 15-22 ⁺⁶	80-94	5	RCPT + RB

3.2. Diagnóstico pré-natal

O ACOG recomenda que, após um rastreio positivo, sejam oferecidos testes diagnósticos invasivos, como amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas (BVC)⁸. A realização de um destes testes permite a análise de todos os cromossomas, identificando não só aneuploidias, como também anomalias cromossômicas estruturais, não detetáveis através dos métodos de rastreio atuais¹¹.

Além de um resultado positivo no rastreio, outras indicações para um procedimento diagnóstico são idade superior a 35 anos na data prevista do parto, história familiar de anomalias genéticas e anomalias fetais/marcadores de aneuploidia na ecografia³.

Embora estudos recentes sugiram um verdadeiro risco de perda fetal menor, este é comumente citado como sendo de 0,5-1%¹⁶. Deste modo, as pacientes devem ser informadas e aconselhadas antes de tomarem a decisão de prosseguir com o procedimento².

3.2.1. Biópsia das Vilosidades Coriônicas

A BVC é o único teste diagnóstico disponível durante o 1º trimestre de gravidez e geralmente é realizado entre as 10 e 14 semanas de gestação. A amostra placentária pode ser obtida através de uma abordagem transabdominal ou transcervical, ambas guiadas por ecografia, não havendo diferença na taxa de perda fetal entre abordagens¹⁷.

A principal vantagem deste procedimento em relação à amniocentese é que permite um diagnóstico mais precoce na gravidez, o que diminui o tempo de incerteza e tranquiliza os pais quando os resultados são normais e, quando anormais, permite o uso de métodos mais precoces, e por isso mais seguros, de interrupção da gravidez, caso seja o desejado¹⁷.

Uma desvantagem é que entre 1-2% dos resultados podem refletir mosaicismos placentários ao invés de anomalias cromossômicas fetais verdadeiras³.

A taxa geral de perda de gravidez após o procedimento é maior que a taxa pós amniocentese devido à taxa aumentada de perda espontânea entre as 9 e as 16 semanas de gestação. Tendo estes dados em conta, a taxa de perda relacionada diretamente com o procedimento parece ser semelhante à relacionada com a amniocentese efetuada mais adiante na gravidez¹⁸. Em estudos mais recentes, a estimativa de perda de gravidez atribuível à BVC é de cerca de 0,2%¹⁹.

Outras complicações relacionadas com a BVC incluem spotting ou sangramento vaginal, que pode ocorrer em até 32,2% das pacientes que realizam o procedimento via transcervical, perda de líquido amniótico e infecção, cuja incidência é inferior a 0,5%¹⁷.

3.2.2. Amniocentese

A amniocentese é o procedimento diagnóstico que é oferecido no 2º trimestre de gravidez, realizado a partir das 15 semanas de gestação¹⁷. Esta técnica utiliza uma agulha estéril que é introduzida no saco amniótico guiada por ecografia para recolher líquido amniótico que posteriormente é enviado para análise. Além do diagnóstico de anomalias genéticas, a amniocentese também pode ser utilizada para o diagnóstico de defeitos do tubo neural e de infecção do líquido amniótico ou do feto³.

Estudos recentes sugerem que a taxa de risco de perda fetal relacionada com a amniocentese é de cerca de 0,1%¹⁹.

Outras complicações relacionadas com o procedimento incluem spotting vaginal transitório ou perda de líquido amniótico, que ocorrem em aproximadamente 1-2% de todas as grávidas, e ainda corioamniotite, que ocorre em menos de 1 em cada 1000 casos. Foram também reportados casos de lesões do feto por agulha, no entanto são muito raras se a amniocentese for guiada continuamente por ecografia¹⁷.

3.2.3. Cordocentese

A cordocentese consiste na colheita de sangue da veia umbilical por via percutânea guiada por ecografia. Normalmente realizada após as 18 semanas de gestação, pode ser utilizada para a análise genética do feto, obtida dentro de 24 a 48 horas, ou ainda para transfusões fetais intrauterinas²⁰.

Este procedimento é raramente necessário, no entanto, pode ser útil na avaliação de mosaicismos cromossómicos identificados na BVC e na amniocentese¹⁷.

A taxa de perda do feto atribuível ao procedimento que se encontra relatada é inferior a 2%¹⁷. Outros riscos relacionados são o sangramento do cordão umbilical, que pode ocorrer em cerca de 20-30% dos casos, bradicardia fetal em 5-10% e infecção vertical do feto, que se estima ter um baixo risco²⁰.

3.3. Teste pré-natal não invasivo

A presença de ADN fetal livre no plasma materno foi primeiramente reportada por *Lo et al.* em 1997¹⁵. Esta descoberta proporcionou o desenvolvimento de um novo método não invasivo de rastreio de aneuploidias fetais, o chamado teste pré-natal não invasivo (NIPT), que tem vindo a ser cada vez mais utilizado desde a sua introdução em 2011¹¹.

Este teste pode ser utilizado para o rastreio de várias anomalias cromossómicas através da análise de pequenos segmentos de ADN fetal existentes no sangue materno². Atualmente existem 3 métodos de análise dos fragmentos, sequenciação total do ADN (massive shotgun sequencing), sequenciação seletiva de cromossomas (chromosome selective sequencing) e análise de polimorfismos de único nucleótido, cuja escolha depende do laboratório^{3, 21}.

O rastreio pode ser realizado em qualquer momento da gestação a partir das 9-10 semanas, sendo os resultados disponibilizados entre 7-10 dias, na forma de positivo, negativo ou sem resultado/indeterminado²¹.

3.3.1. Fração Fetal

O ADN livre (cfDNA) consiste em pequenos fragmentos de ADN que são libertados no plasma como resultado do turnover celular fisiológico (apoptose e necrose). Na mulher grávida, a maioria é derivada do turnover de células maternas, porém, uma porção provém da camada trofoblástica placentária que, geralmente, reflete o genótipo fetal, sendo então denominada de fração fetal (FF)¹⁶.

O cfDNA de origem placentária pode ser detetado no plasma materno precocemente na gravidez e a sua quantidade aumenta com o tempo de gestação¹⁴. De facto, tão cedo como às 10 semanas de gestação, o valor médio da FF já é de 10%³. Por outro lado, é eliminado rapidamente da circulação materna após o parto, o que significa que o ADN livre fetal detetado no plasma representa apenas o ADN do feto atual e não de fetos prévios, o que é importante no caso da mulher ser múltipara¹⁴.

Os diferentes fragmentos de cfDNA podem ser diferenciados em maternos e fetais através do seu comprimento, sendo os fragmentos fetais mais curtos em comparação com os de origem materna²².

A importância da fração fetal está relacionada com a performance clínica do NIPT, uma vez que a sua capacidade de deteção de aneuploidias fetais depende da quantidade de fragmentos de ADN fetais presentes na amostra total. Ou seja, se fração fetal for demasiado pequena, qualquer anomalia no cfDNA fetal vai ser mascarada pela grande quantidade de cfDNA euploide de origem materna²³. Desta forma, é necessária uma FF mínima de 4% para uma análise confiável^{3, 23-25}. Sobrestimativas da FF podem levar a resultados falsos negativos, enquanto subestimativas podem rejeitar amostras adequadas para análise²³.

Uma pequena percentagem das amostras submetidas para análise não obtém qualquer resultado, sendo a causa mais comum deste fenómeno uma FF reduzida¹⁴. Vários fatores, tanto maternos como fetais, influenciam a fração fetal, incluindo a idade gestacional, o peso materno e a aneuploidia fetal²².

Pode ser observado um aumento da FF ao longo de toda a gestação, no entanto, a taxa de aumento varia com o decorrer das semanas. Assim, a taxa de aumento mais baixa ocorre entre as 10 e as 21 semanas de gestação, sendo de cerca de 0,1% por semana, a partir da qual pode ser esperado um aumento semanal de aproximadamente 1%²²⁻²⁴.

Quanto ao estado de aneuploidia fetal, há evidências de que a FF tende a ser superior nas amostras positivas para T21 e inferior naquelas positivas para trissomia 18 ou 13, em comparação com amostras euploides²². Contudo, a influência deste fator na FF depende da idade gestacional, pelo que o aumento associado à T21 só é relevante a partir da 16^a semana de gestação, e a diminuição associada às trissomias 18 e 13 só é significativa até à 21^a e 18^a semanas de gestação, respetivamente²³.

De todos os fatores que influenciam a FF, o peso, o índice de massa corporal (IMC) e o volume sanguíneo maternos são os mais significativos, apresentado uma forte relação inversa que pode advir de 2 efeitos simultâneos²³. Em primeiro lugar, nas mulheres obesas há um aumento do turnover celular do tecido adiposo o que resulta num aumento significativo da quantidade de cfDNA de origem materna em circulação sem que haja diferença na quantidade de cfDNA de origem fetal. Este facto torna a FF menor em grávidas obesas quando comparadas com grávidas com um peso/IMC dentro da normalidade^{14, 25}. Na verdade, a percentagem de grávidas com uma FF inferior ao necessário para a obtenção de um resultado aumenta de <1% se o peso materno for de 60 Kg para >50% se o peso for de 160Kg¹⁴. Em segundo lugar, a relação pode ser explicada pelo efeito da diluição de uma quantidade constante de cfDNA fetal numa quantidade superior de volume sanguíneo materno, uma vez que este volume é uma consequência direta do peso da grávida^{23, 26}. No entanto, ainda não foi estabelecido um limiar específico para o peso/IMC materno a partir do qual não se consegue obter um resultado²⁴.

Por outro lado, fatores como a idade materna, resultados de rastreio pré-natal e medida da TN, normalmente associados com o risco à priori de trissomia, não têm qualquer influência na percentagem de cfDNA fetal²⁴.

Outra causa recentemente descoberta como responsável pela não obtenção de qualquer resultado a partir de amostras enviadas para análise é o uso de heparina de baixo peso molecular. Porém, o mecanismo responsável pela sua interferência ainda não é conhecido, devendo a amostra de sangue ser colhida o mais espaçada no tempo possível da dose mais recente do fármaco¹⁴.

3.3.2. Aplicações e performance clínica

3.3.2.1. Aneuploidias autossómicas

As trissomias 21,18 e 13 são as trissomias autossómicas mais comuns e estão associadas a padrões previsíveis de deficiência intelectual e defeitos congénitos²². Por este motivo, desde a sua introdução, em 2011, que o NIPT tem sido utilizado para o seu rastreio¹¹.

Segundo uma meta-análise recente, este método de rastreio apresenta a taxa de deteção mais alta de todos os métodos de rastreio disponíveis, detetando mais de 99% dos fetos com T21, 98% dos fetos com T18 e 99% dos fetos com T13, com uma taxa combinada de falsos positivos de apenas 0,13%²⁷. Apesar da maioria dos estudos serem realizados numa população de alto risco, vários estudos já demonstraram que a performance do teste na população obstétrica em geral é equivalente à performance nas grávidas de alto risco^{13, 28, 29}.

Apesar do termo ADN livre fetal ser comumente utilizado, é importante não esquecer que o ADN relacionado com a gravidez reflete apenas o genoma placentário, o que significa que podem existir diferenças entre os cariótipos fetal e placentário nos casos de mosaicismo placentário¹⁴. Este facto pode explicar uma parte dos resultados discordantes com o verdadeiro cariótipo fetal. Outras causas que podem levar ao aparecimento de falsos positivos são a morte precoce de um feto gémeo aneuploide ou alterações cromossómicas maternas não conhecidas.³⁰

3.3.2.2. Aneuploidias dos cromossomas sexuais

Apesar da maioria dos casos de aneuploidia dos cromossomas sexuais (ACS), incluindo o síndrome de Turner/Monossomia X (45,X), o síndrome de Klinefelter (47,XXY ou 48,XXYY), o síndrome do triplo X (47,XXX) e o síndrome 47,XYY, serem leves e sem qualquer incapacidade intelectual, alguns apresentam um fenótipo bem definido que pode incluir anormalidades físicas, atrasos no desenvolvimento e infertilidade⁴. Deste modo, é compreensível que muitos pais pretendam o rastreio pré-natal destas condições genéticas, contudo, a maioria não está associada a anomalias estruturais passíveis de serem identificadas por ecografia ou a perfis bioquímicos anormais, o que torna os métodos tradicionais de rastreio pré-natal incapazes de as detetar⁵. Na verdade, com a utilização do rastreio combinado do 1º trimestre, a deteção de ACS tem sido frequentemente um achado incidental aquando da realização de procedimentos diagnósticos posteriores a um rastreio positivo para uma das 3 trissomias autossómicas³¹. A única exceção é a síndrome de Turner que pode apresentar achados ecográficos como higromas quísticos, TN fetal aumentada, defeitos cardíacos e hidrópia fetal. No entanto, estes achados podem estar associados a outras anomalias genéticas, sendo necessários testes invasivos para a avaliação do cariótipo fetal⁵.

Está provado que a análise do cfDNA é viável para a avaliação do risco de tais aneuploidias^{4, 5, 31-33}, apresentando uma taxa de deteção de 95,8% para a monossomia X com uma taxa de falsos positivos de 0,14%²⁷. Quanto à deteção de outras aneuploidias, o número

total de casos examinados é demasiado pequeno para que se possam tirar conclusões exatas quanto à performance clínica nesses casos.²²

Vários fatores biológicos tornam o rastreio de ACS através do cfDNA um desafio. Em primeiro lugar é necessário ter em conta a incidência de mosaicismo de origem materna⁵. À medida que as mulheres envelhecem, há uma perda natural do cromossoma X, o que resulta num mosaicismo basal da mulher sem perda da sua capacidade fértil³⁴. Da mesma forma, até 90% das mulheres com uma trissomia X e, embora menos provável, mulheres com uma monossomia X em mosaico, não estão a par da sua condição genética⁵. Estes fatores podem levar a resultados discordantes com o genótipo fetal devido a contagens de fragmentos do cromossoma X aumentadas ou diminuídas que são interpretadas como ACS do feto⁴. Por outro lado, outro fator que pode confundir a análise do cfDNA é a presença de mosaicismo fetal⁵. Cerca de 15% dos casos XXY, 10% dos casos XXX e até 50% dos casos de monossomia X são mosaicos, o que leva a uma distribuição não uniforme dos fragmentos X e Y que pode impedir a correta classificação de uma ACS fetal⁵.

3.3.2.3. Gravidez múltipla

A incidência de gestações múltiplas tem vindo a aumentar em todo o mundo, principalmente devido ao uso aumentado de técnicas de reprodução assistida, bem como à tendência para o aumento da idade materna da população³⁵. Em comparação com gestações unifetais, não só há um risco aumentado para aneuploidias fetais, como também o risco de perda fetal relacionado com a realização de procedimentos diagnósticos invasivos é superior³⁶.

Apesar disso, nenhum dos métodos de rastreio tradicionais é tão preciso em gestações gemelares quanto em gestações unifetais². A complexidade do rastreio está relacionada com corionicidade/zigotia, visto que os fetos podem ser monozigóticos, ou seja, geneticamente idênticos, ou dizigóticos, o que significa que são geneticamente diferentes e, neste caso, é possível que apenas um tenha uma aneuploidia, sendo necessário avaliar individualmente o risco³⁷. O rastreio convencional a partir de marcadores bioquímicos, tanto no primeiro como no segundo trimestre, tem sido amplamente utilizado³⁸, contudo, a sua interpretação é problemática uma vez que não se sabe qual a contribuição de cada feto para o valor total do marcador³⁹. Também a medida da TN tem sido extensivamente utilizada nas gestações múltiplas pois permite um rastreio independente de cada feto², no entanto, em gestações gemelares monocoriónicas, a taxa de falsos positivos é elevada pois um aumento da TN num dos fetos, além de ser um marcador de anomalias cromossómicas, é uma manifestação precoce do síndrome de transfusão feto-fetal⁶. Desta forma, há uma necessidade urgente para que se desenvolvam novos e melhores métodos de rastreio de aneuploidias fetais em gestações gemelares³⁸.

Quanto ao rastreo através da análise de cfDNA presente no sangue materno, este é também mais complexo em gestações gemelares em comparação com gestações unifetais, principalmente se os fetos forem dizigóticos²². Nestes casos, a contribuição de cada feto para a quantidade total de ADN livre pode variar em quase o dobro, especialmente se existir discordância para a aneuploidia³⁸. Como consequência, caso a FF do feto trissômico esteja abaixo do limiar necessário para uma análise bem sucedida (4%), mas houver uma alta contribuição do gémeo dissômico de forma a que a FF total seja satisfatória, pode ser obtido um resultado errado de baixo risco de aneuploidia⁴⁰. Para evitar este erro, foi proposto que se deve utilizar a menor FF dos 2 fetos, em vez da total.³⁵ No entanto, este método leva a uma taxa superior de falha do teste nas gestações múltiplas em comparação com a obtida nas gestações unifetais³⁶.

Apesar destas dificuldades, vários estudos demonstram a viabilidade desta metodologia para a avaliação do risco das trissomias 21,18 e 13 em gestações gemelares^{35, 36, 40}, contudo, é importante não esquecer que a performance do teste nestes casos é inferior à previamente relatada nas gestações de feto único¹⁶.

3.3.2.4. Outras

O NIPT pode ser utilizado para a identificação do sexo fetal e do genótipo Rh do feto nos casos de alto risco de isoimunização Rh, apresentando alta sensibilidade e especificidade⁴¹.

Vários laboratórios já começaram a fornecer o risco para outras aneuploidias autossômicas, como trissomia 16 e 22, e microdeleções. Contudo, estas condições genéticas são raras e, no caso das trissomias 16 e 22, resultam em perda fetal precoce. Assim, o seu rastreo através do cfDNA não foi ainda clinicamente validado e não é recomendado².

3.3.3. Comparação com aos atuais métodos

Quando comparado com os métodos de rastreo pré-natal já estabelecidos e realizados, tanto no 1º como no 2º trimestres, o desempenho do rastreo das trissomias 21, 18 e 13 através do NIPT é superior, não só em termos de taxa de deteção mais elevada, como também de taxa de falsos positivos menor²⁷, ou seja, apresenta tanto uma sensibilidade como uma especificidade superior¹³.

Ao contrário dos complexos algoritmos realizados atualmente, que requerem múltiplos testes sanguíneos, o NIPT oferece uma alta precisão sendo apenas necessário uma única colheita de sangue⁹.

Um benefício adicional é ter uma janela de idade gestacional mais ampla para a sua realização (qualquer momento, a partir das 10 semanas) em comparação com o RCPT, o que proporciona tranquilidade aos pais quando o resultado é negativo e, no caso de ser positivo,

permite atitudes diagnósticas mais precoces, o que pode levar a uma interrupção voluntária da gravidez mais segura, caso seja essa a opção da grávida⁴².

Apesar destes benefícios, atualmente, o custo do rastreio através da análise do ADN livre é considerado demasiado elevado para que possa ser introduzido como método de rastreio primário²². Outra limitação do teste é o facto de não avaliar o risco anomalias estruturais, como defeitos do tubo neural ou da parede ventral².

3.3.4. Influência nos procedimentos invasivos

A disponibilidade e os benefícios percetíveis do NIPT resultaram numa crescente popularidade entre as grávidas que procuram evitar o risco de uma perda fetal relacionada com os procedimentos invasivos de diagnóstico⁴³.

A implementação do NIPT levou a uma diminuição a nível mundial dos procedimentos invasivos de diagnóstico⁴⁴ devido às taxas muito baixas de falsos positivos a ele associadas²².

Tendo em consideração que é essencial que os obstetras que prestam serviços de diagnóstico pré-natal permaneçam bem treinados nos procedimentos, uma consequência preocupante do declínio observado é que possa resultar num aumento das complicações dos procedimentos, devido à falta de médicos experientes nas técnicas⁴⁵.

3.3.5. Prática clínica

Desde a introdução do teste pré-natal não invasivo na prática clínica que não existem recomendações consistentes sobre como implementá-lo nos algoritmos de rastreio atuais¹¹, tendo sido propostos vários modelos (Figura1)²².

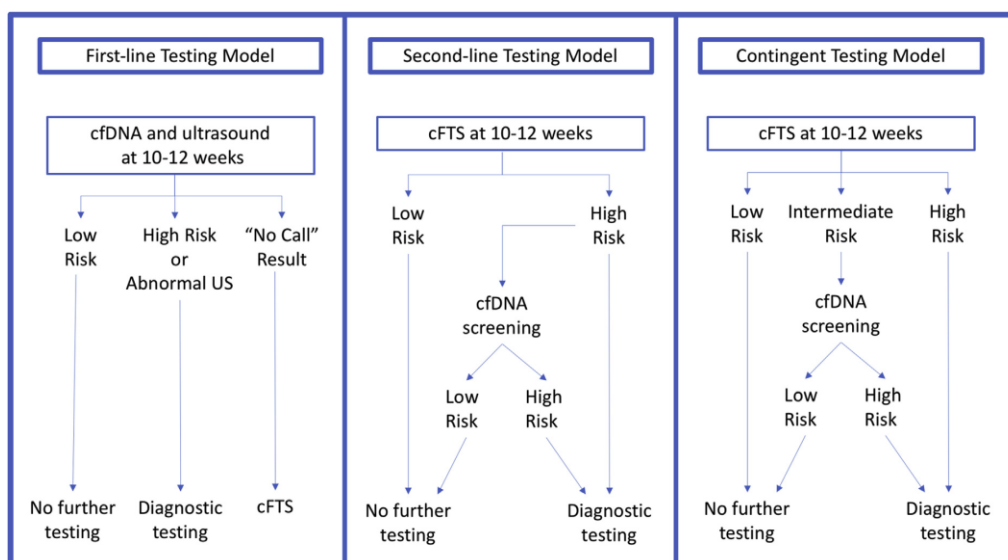


Figura 1. Modelos propostos para a implementação do NIPT na prática clínica²²

Uma primeira proposta é a sua utilização como teste de rastreio de primeira linha, ou seja, em todas as grávidas que pretendam um rastreio pré-natal de aneuploidias. Contudo, apesar de *guidelines* recentes recomendarem que a análise do ADN livre seja oferecida às grávidas devido às taxas de deteção superiores^{2, 46, 47}, este método continua a ter um custo elevado, o que limita a sua aceitação universal como teste de primeira linha²².

Uma segunda proposta é o modelo contingente, no qual o NIPT é efetuado após um resultado inicial do rastreio combinado do 1º trimestre¹⁶. Através deste primeiro rastreio as grávidas são estratificadas em 3 categorias de risco e, com base nessas categorias, são-lhes oferecidas diferentes opções. Às que obtêm um baixo risco de feto com aneuploidia, não são recomendados outros testes subsequentes, às que obtêm alto risco são oferecidos testes de diagnóstico, atualmente invasivos, ou o NIPT, e às grávidas que apresentam um risco intermédio é oferecido apenas o NIPT²². Esta população de risco intermédio beneficia da análise do cfDNA uma vez que esta corrige o risco para muito alto ou muito baixo, tornando assim a decisão a favor ou contra procedimentos diagnósticos mais fácil¹². Este modelo, se aplicado, levaria a uma taxa de deteção muito alta e a uma taxa de procedimentos invasivos muito baixa a um custo consideravelmente menor, quando comparado com a utilização do NIPT como teste de primeira linha⁴⁸.

A última proposta é a utilização do NIPT como teste de rastreio de segunda linha, ou seja, apenas às grávidas que recebem um resultado positivo (alto risco) num teste de rastreio tradicional e preferem um segundo teste de rastreio antes de considerar ou de prosseguir para um teste diagnóstico²¹. *Hill et al.* demonstraram esta forte preferência por testes sem risco de perda fetal, mesmo que tal teste não fosse totalmente preciso, sendo a segurança do feto primordial na tomada de decisão⁴³.

Tanto no modelo contingente como no rastreio de segunda linha, nos casos em que o teste falha, as grávidas podem recorrer aos resultados do RCPT para tomar uma decisão em relação aos testes invasivos de diagnóstico. Estas estratégias mantêm também as vantagens da ecografia e da bioquímica, incluindo a datação precisa da gravidez, a deteção precoce de muitos defeitos estruturais do feto e a previsão de complicações da gravidez, incluindo pré-eclâmpsia e parto prematuro⁴⁸.

Atualmente, o ACOG apenas recomenda o uso NIPT para o rastreio de aneuploidias autossômicas em grávidas com alto risco pré-teste para aneuploidia, ou seja, como teste de rastreio secundário. Esta população engloba mulheres com idade igual ou superior a 35 anos na altura do parto, fetos com achados ecográficos sugestivos de risco aumentado de aneuploidia, mulheres com história de gravidez prévia com trissomia, um dos pais portador de translocação robertsoniana que aumente o risco de trissomia 13 ou 21 e grávidas com resultados positivos nos testes de rastreio do 1º ou 2º trimestres⁴⁹. Esta limitação do teste à população de alto risco é consequência da variação do valor preditivo positivo entre as grávidas de alto e baixo risco. Este valor indica a probabilidade de uma grávida com resultado positivo ter realmente um feto afetado e depende da prevalência da aneuploidia na

população. Na população em geral, ou seja, de baixo risco, o facto da prevalência das aneuploidias ser menor leva a valores preditivos positivos mais baixos, o que significa que haverá uma percentagem menor de verdadeiros positivos em comparação com a população de alto risco²¹.

É importante não esquecer que o NIPT é um teste de rastreio, tendo, portanto, potencial para falsos-positivos e falsos-negativos, não devendo ser usado como um substituto dos testes diagnósticos². O diagnóstico de um defeito cromossómico apenas pode ser feito através de testes invasivos¹, que devem ser oferecidos a todas as grávidas com um resultado positivo na análise do cfDNA antes que seja tomada uma decisão irreversível, como a interrupção da gravidez².

Um critério essencial a ter em consideração aquando do aconselhamento sobre o NIPT é a percentagem que não obtém qualquer resultado, uma vez que publicações recentes mostram que, nestes casos, a taxa de trissomias é alta¹¹. Desta forma, está recomendado que sejam considerados testes invasivos se a análise do cfDNA for inconclusiva⁴⁹. Uma ecografia detalhada pode ajudar a contextualizar a falha do teste, ajudando na decisão de prosseguir ou não com um teste diagnóstico nestes casos¹⁶. Por outro lado, esta falha pode estar relacionada com a obesidade materna, já que este fator influencia de forma significativa a FF de ADN livre. Assim, os médicos devem ter em consideração este facto no aconselhamento pré-teste e ter planos de contingência para formas alternativas de rastreio caso refiram mulheres obesas para o NIPT¹⁴.

Guidelines recentes recomendam que as grávidas sejam informadas da possibilidade de rastreio de aneuploidias dos cromossomas sexuais através do NIPT, tendo a opção de aceitar ou de recusar essa parte do teste^{46, 47, 49}. O rastreio pré-natal destas aneuploidias pode oferecer benefícios importantes, incluindo a oportunidade de intervenção precoce, particularmente na síndrome de Turner e Klinefelter, que normalmente não são diagnosticados até à puberdade, melhorando a qualidade de vida da criança afetada e possibilitando uma adaptação dos pais ao diagnóstico^{31, 50}.

A determinação pré-natal do sexo fetal é possível através do NIPT. Embora o conhecimento precoce do sexo fetal seja de interesse pessoal significativo para muitos pais, existem situações em que pode ser de grande valor clínico, como por exemplo, ambiguidade dos genitais na ecografia ou história familiar de condições genéticas ligadas ao cromossoma X⁵.

É também possível determinar o genótipo Rh do feto, o que tem implicações económicas, uma vez que elimina a necessidade de profilaxia da isoimunização Rh com imunoglobulina anti-D a todas as grávidas Rh-negativas⁴¹.

Quanto ao uso em gestações múltiplas e no rastreio de microdeleções, o NIPT, atualmente, não está recomendado^{2, 49}.

A introdução deste novo método de rastreio na prática clínica não deve ter como intenção substituir a ecografia das 11-13 semanas²⁸. Esta é recomendada de forma a confirmar o número de fetos e a idade gestacional, e para avaliar a presença de anomalias major identificáveis no 1º trimestre, uma vez que a sua presença altera o risco de aneuploidia à priori³. É de salientar que o NIPT não avalia o risco anomalias estruturais, como defeitos do tubo neural ou da parede ventral. Desta forma, as grávidas submetidas a este método de rastreio devem realizar a avaliação destas anomalias através de ecografia ou da medição da AFP sérica⁴⁹.

Por fim, é preciso ter em conta que, ocasionalmente, o rastreio com este método poderá revelar anormalidades cromossómicas maternas, como mosaísmo, ou, mais raramente, malignidade materna, sendo recomendado o aconselhamento prévio sobre esta possibilidade³.

4. Discussão

O diagnóstico pré-natal na gravidez permite saber se o feto tem risco acrescido de ser afetado por alguma anomalia, no entanto, atualmente, apenas está disponível através de procedimentos invasivos que estão associados ao risco de perda fetal. De forma a reduzir este risco, na maior parte dos países desenvolvidos, o rastreo é realizado por rotina antes de qualquer diagnóstico definitivo, com o objetivo de identificar as grávidas com risco acrescido de anomalias cromossômicas⁵¹.

Entre os atuais métodos de rastreo utilizados na prática clínica, o RCPT ainda é considerado o *gold standard* para a detecção de aneuploidias fetais. No entanto, esta abordagem tem sido desafiada pela introdução do novo método de rastreo através da análise do ADN livre, que representa um avanço significativo no rastreo de aneuploidias fetais¹.

O NIPT, em comparação com o RCPT, apresenta um desempenho superior no rastreo das trissomias 21, 18 e 13, além de possibilitar também o rastreo de aneuploidias dos cromossomas sexuais e a determinação do sexo e do genótipo Rh fetais. Apesar de atualmente não recomendado, a sua utilização é viável para o rastreo de aneuploidias em gestações múltiplas. Em contrapartida, e apesar da heterogeneidade dos resultados obtidos em várias avaliações económicas, a sua introdução como método universal de rastreo não é considerada custo-efetiva, a não ser que o custo do teste diminua substancialmente⁵².

A melhor abordagem para a sua introdução na prática clínica parece ser o modelo contingente, uma vez que permite uma taxa de detecção muito alta e, ao mesmo tempo, diminui o número de procedimentos invasivos necessários a um custo considerado aceitável, em comparação com o seu uso em primeira linha¹.

Sob um ponto de vista menos positivo, uma consequência do declínio do número de procedimentos invasivos é uma diminuição da segurança destes mesmos procedimentos. É indiscutível que o volume de procedimentos realizados é um fator importante para a competência operacional e para a minimização das taxas de complicações. Assim, com a redução do número de procedimentos necessários, o treino de novos profissionais é prejudicado, uma vez que é fundamental a realização de um número elevado para que a curva de aprendizagem inerente a qualquer técnica seja ultrapassada⁴⁵. É então essencial encontrar soluções para garantir que a diminuição da experiência não aumente a taxa de perda fetal associada às técnicas.

Um ponto crucial em todo o processo de vigilância pré-natal é o aconselhamento materno. Todas as grávidas devem ser informadas que o rastreo é opcional sendo com elas revistas todas as opções de rastreo e diagnóstico disponíveis²². Devem também compreender as implicações dos resultados dos testes, incluindo a probabilidade de falha, antes de realmente se submeterem a qualquer tipo de teste⁵³. Grávidas com resultados positivos em qualquer teste de rastreo devem ser encaminhadas para aconselhamento genético adicional

de forma a discutir as várias opções que se encontram disponíveis face a tais resultados. Quanto às grávidas com resultados negativos, é necessário que compreendam que um resultado negativo não elimina a possibilidade de o feto ter uma condição genética ou um defeito congénito²².

Por fim, é de realçar que a vigilância pré-natal não engloba simplesmente o rastreio das trissomias mais comuns, pelo contrário, este é apenas uma parte de uma avaliação fetal para anomalias cromossómicas gerais, anomalias estruturais fetais e síndromes genéticas e não genéticas. Assim, mesmo que o NIPT se torne economicamente mais acessível, a avaliação estrutural fetal precoce através de ecografia e rastreio, que inclui a medida da TN fetal, bem como a medição de parâmetros bioquímicos e biofísicos, deve continuar a fazer parte da avaliação fetal do primeiro trimestre¹. Esta abordagem permite o diagnóstico de um maior número de anomalias, tanto cromossómicas como não cromossómicas, além de identificar grávidas com um risco superior para distúrbios que muitas vezes não são aparentes até mais tarde na gravidez.

5. Conclusão - Perspetivas Futuras

A adoção do rastreo de aneuploidias através da análise do cfDNA fetal no sangue materno continua a crescer à medida que os profissionais de saúde reconhecem as vantagens de um teste com uma sensibilidade superior e com uma taxa menor de falsos positivos quando comparado com o método de rastreo tradicional⁵.

No futuro, o uso desta nova técnica de rastreo pode também melhorar a deteção de outras anomalias cromossómicas e síndromes raras. Contudo, a prevalência inerentemente baixa da maioria destes distúrbios torna difícil a obtenção de valores preditivos positivos elevados, o que faz com que a introdução do rastreo para tais distúrbios incomuns não tenha ainda obtido uma ampla aceitação. Em contrapartida, pode ser útil em casos individuais, como por exemplo, se existir história familiar fortemente positiva ou se o nível de suspeita for suficientemente elevado devido à presença de marcadores ecográficos específicos¹.

Como o número de aplicações deste teste continua a aumentar, é de extrema importância que os obstetras recebam formação apropriada em genética e que haja material educacional claro e conciso para oferecer às grávidas. Novas ferramentas de aconselhamento, como auxiliares de decisão, são também necessárias e a sua utilização deve ser testada de forma a determinar se podem melhorar a compreensão da grávida sobre as várias opções de rastreo e diagnóstico²².

O teste pré-natal não invasivo já teve um impacto significativo em toda a população no que toca à utilização dos testes de rastreo convencionais e de diagnóstico, estando a tornar-se uma opção de primeira linha em algumas populações de alto nível socioeconómico²². No entanto, não deixa de ser um teste de rastreo, o que faz com que os testes invasivos de diagnóstico continuem a ter um papel chave no diagnóstico pré-natal, tanto no presente, como no futuro próximo, particularmente na avaliação genómica de fetos com anomalias estruturais, bem como na confirmação de resultados positivos no NIPT.

Quanto à manutenção da segurança dos procedimentos invasivos, como já dito acima, é essencial encontrar soluções para garantir que a diminuição do número de procedimentos realizados não aumente a taxa de perda fetal associada às técnicas. É provável que seja necessário reavaliar o modo como a formação dos profissionais nestas técnicas é realizada, uma vez que é possível que a abordagem tradicional de confiar apenas no volume clínico para alcançar e manter a competência se torne insustentável⁴⁵. Alguns países permitem que os internos treinem os procedimentos em mulheres que vão ser submetidas a interrupção da gravidez, ou após um diagnóstico precoce de gravidez inviável. Esta abordagem, além de permitir a formação dos profissionais sem a preocupação de causar aborto espontâneo, também pode proporcionar benefícios à mulher, como informação sobre o cariótipo fetal após a perda do feto. Uma alternativa à prática em grávidas são os modelos de simulação, contudo, um desafio constante é como incorporar a variação clínica e os diferentes graus de

dificuldade nesses modelos sintéticos. Apesar disso, são uma alternativa com o potencial de encurtar a curva de aprendizagem dos internos antes de realizarem as técnicas em humanos⁴⁵.

Embora o rastreamento através do NIPT tenha demonstrado grande sucesso na detecção de aneuploidias comuns, muitas questões técnicas, clínicas, económicas e éticas ainda carecem de respostas. Assim, é fundamental que a investigação nesta área continue uma vez que este novo teste tem potencial para ser incorporado nos algoritmos de rastreamento atualmente em prática ou mesmo substituí-los.

No entanto, apesar da análise do cfDNA ser o teste do futuro no que toca ao rastreamento pré-natal de anomalias cromossómicas, atualmente o seu custo é demasiado elevado para que possa ser oferecido como rastreamento primário a todas as grávidas. Desta forma, é essencial que o custo do teste se torne mais acessível, já que este parece ser o ponto chave para a sua implementação universal.

6. Lista de Referências

1. Kagan KO, Sonek J, Wagner P, Hoopmann M. Principles of first trimester screening in the age of non-invasive prenatal diagnosis: screening for chromosomal abnormalities. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(4):645-51.
2. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics CoG, the Society for Maternal-Fetal M. Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016;127(5):e123-37.
3. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2017;44(2):245-56.
4. Nicolaides KH, Musci TJ, Struble CA, Syngelaki A, Gil MM. Assessment of fetal sex chromosome aneuploidy using directed cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(1):1-6.
5. Hooks J, Wolfberg AJ, Wang ET, Struble CA, Zahn J, Juneau K, et al. Non-invasive risk assessment of fetal sex chromosome aneuploidy through directed analysis and incorporation of fetal fraction. *Prenat Diagn*. 2014;34(5):496-9.
6. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):7-15.
7. Park SY, Jang IA, Lee MA, Kim YJ, Chun SH, Park MH. Screening for chromosomal abnormalities using combined test in the first trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol Sci*. 2016;59(5):357-66.
8. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(4):319 e1-9.
9. Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(2):137 e1-8.
10. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn*. 2012;32(1):3-9.
11. Flock A, Tu NC, Ruland A, Holzgreve W, Gembruch U, Geipel A. Non-invasive prenatal testing (NIPT): Europe's first multicenter post-market clinical follow-up study validating the quality in clinical routine. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(5):923-8.

12. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):322 e1-5.
13. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1589-97.
14. Hui L. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA - New implications for maternal health. *Obstet Med.* 2016;9(4):148-52.
15. Russo ML, Blakemore KJ. A historical and practical review of first trimester aneuploidy screening. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19(3):183-7.
16. Harraway J. Non-invasive prenatal testing. *Aust Fam Physician.* 2017;46(10):735-9.
17. American College of O, Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2007;110(6):1459-67.
18. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007;110(3):687-94.
19. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):16-26.
20. Wilson RD, Gagnon A, Audibert F, Campagnolo C, Carroll J, Genetics C. Prenatal Diagnosis Procedures and Techniques to Obtain a Diagnostic Fetal Specimen or Tissue: Maternal and Fetal Risks and Benefits. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015;37(7):656-68.
21. Dashe JS. Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2016;128(1):181-94.
22. Harris S, Reed D, Vora NL. Screening for fetal chromosomal and subchromosomal disorders. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017.
23. Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, Wang H, Guan X, McCullough RM, et al. Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):816-22.
24. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):662-6.
25. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):26-32.
26. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):667-74.

27. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;50(3):302-14.
28. Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(5):374 e1-6.
29. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808.
30. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2016;6(1):e010002.
31. Kornman L, Palma-Dias R, Nisbet D, Scott F, Menezes M, da Silva Costa F, et al. Non-Invasive Prenatal Testing for Sex Chromosome Aneuploidy in Routine Clinical Practice. *Fetal Diagn Ther.* 2017.
32. Mazloom AR, Dzakula Z, Oeth P, Wang H, Jensen T, Tynan J, et al. Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):591-7.
33. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012;119(5):890-901.
34. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116(3):181-5.
35. del Mar Gil M, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):204-11.
36. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordonez E, Cirigliano V, Dierickx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):61-6.
37. Shi X, Li L, Huang X, Chen B, Zhou Y, Fang Q. Fetal Aneuploidy: A Comparison of Dichorionic Twins and Monochorionic Twins. *Fetal Diagn Ther.* 2017.
38. Du E, Feng C, Cao Y, Yao Y, Lu J, Zhang Y. Massively Parallel Sequencing (MPS) of Cell-Free Fetal DNA (cffDNA) for Trisomies 21, 18, and 13 in Twin Pregnancies. *Twin Res Hum Genet.* 2017;20(3):242-9.
39. Evans MI, Andriole S, Evans SM. Screening and Testing in Multiples. *Clin Lab Med.* 2016;36(2):289-303.

40. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(6):705-11.
41. Mackie FL, Hemming K, Allen S, Morris RK, Kilby MD. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG.* 2017;124(1):32-46.
42. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Orosz G, Nicolaides KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):36-41.
43. Hill M, Fisher J, Chitty LS, Morris S. Women's and health professionals' preferences for prenatal tests for Down syndrome: a discrete choice experiment to contrast noninvasive prenatal diagnosis with current invasive tests. *Genet Med.* 2012;14(11):905-13.
44. Warsof SL, Larion S, Abuhamad AZ. Overview of the impact of noninvasive prenatal testing on diagnostic procedures. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):972-9.
45. Hui L, Tabor A, Walker SP, Kilby MD. How to safeguard competency and training in invasive prenatal diagnosis: 'the elephant in the room'. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(1):8-13.
46. Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 2015;35(8):725-34.
47. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016;18(10):1056-65.
48. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(3):249-66.
49. Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2015;126(3):e31-7.
50. Bevilacqua E, Ordonez E, Hurtado I, Rueda L, Mazzone E, Cirigliano V, et al. Screening for Sex Chromosome Aneuploidy by Cell-Free DNA Testing: Patient Choice and Performance. *Fetal Diagn Ther.* 2017.
51. Garcia-Perez L, Linertova R, Alvarez-de-la-Rosa M, Bayon JC, Imaz-Iglesia I, Ferrer-Rodriguez J, et al. Cost-effectiveness of cell-free DNA in maternal blood testing for prenatal detection of trisomy 21, 18 and 13: a systematic review. *Eur J Health Econ.* 2017.
52. Nshimyumukiza L, Menon S, Hina H, Rousseau F, Reinharz D. Cell-free DNA noninvasive prenatal screening for aneuploidy versus conventional screening: a systematic review of economic evaluations. *Clin Genet.* 2017.

53. Verweij EJ, Jacobsson B, van Scheltema PA, de Boer MA, Hoffer MJ, Hollemon D, et al. European non-invasive trisomy evaluation (EU-NITE) study: a multicenter prospective cohort study for non-invasive fetal trisomy 21 testing. *Prenat Diagn.* 2013;33(10):996-1001.

